

<https://doi.org/10.60043/2949-5938-2023-2-7-32>



Современные подходы к созданию 2D- и 3D-клеточных моделей для изучения фиброза легких

А.Е. Толстолужинская, Н.А. Басалова, А.Ю. Ефименко

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»,
119192, г. Москва, Ленинские горы, 1, Россия

Адрес для корреспонденции: tolstoluzhinskayaae@my.msu.ru

Аннотация

Фиброз легких является следствием многих воздействий, ведущих к повреждению ткани легкого и развитию последующего воспаления. Фиброз представляет собой разрастание соединительной ткани, которое может приводить к нарушению архитектоники легких и снижать их функциональность вплоть до летального исхода. При этом в настоящее время механизмы, лежащие в основе фиброгенеза, недостаточно изучены. В связи с этим задача по их изучению не теряет своей актуальности, и для ее решения требуется разработка моделей фиброза легких, способных отразить все ключевые процессы фиброгенеза. Модель *in vivo* с использованием животных обладает множественными неоспоримыми преимуществами, но при этом имеет строгие этические ограничения и не отражает всех механизмов фиброза легких, свойственных человеческому организму. При этом в исследованиях *in vitro* ученые могут позволить себе использовать биоматериалы не только животных, но и человека и на их основе строить клеточные системы — от 2D- до 3D-моделей. Моделирование фиброза легких преимущественно основано на использовании основных типов клеток, вовлеченных в развитие фиброза легких, таких как миофибробласты, фибробласты, альвеолоциты и других. Некоторые модели базируются также на специфическом фиброз-ассоциированном внеклеточном матриксе и дальнейшем изучении взаимодействия клеток как друг с другом, так и с матриксом.

Стоит учитывать, что в разных моделях отображаются естественных процессов фиброгенеза, что требует от исследовательского сообщества использования широкого круга моделей. Учитывая многофакторность патогенеза фиброза легких, важно понимать всю совокупность происходящих процессов для получения полноты реальной картины, близкой к картине *in vivo*, в связи с чем важна многокомпонентность моделей. В данном обзоре акцентировано внимание на анализе различных моделей фиброза легких *in vitro* в двумерных и трехмерных системах, отображены подходы к их созданию, ключевые различия, основные преимущества и недостатки моделей, как частные, так и общие.

Ключевые слова: фиброз легких, модели фиброза, миофибробласты, TGF- β , сфероиды, органоиды, профибротический матрикс

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Для цитирования: Толстолужинская А.Е., Басалова Н.А., Ефименко А.Ю. Современные подходы к созданию 2D- и 3D-клеточных моделей для изучения фиброза легких. *Регенерация органов и тканей*. 2023;1(2):7–32. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2023-2-7-32>

Поступила 02.11.2023

Обработана 22.11.2023

Принята к публикации 11.12.2023

Modern approaches to the creation of 2D and 3D cellular models for the study of lung fibrosis

Anastasiya E. Tolstoluzhinskaya, Nataliya A. Basalova, Anastasiya Y. Efimenko

Lomonosov Moscow State University, Russian Federation, Moscow, Leninskie Gory, 1, 119991

Correspondence address: tolstoluzhinskayaae@my.msu.ru

Annotation

Lung fibrosis is a consequence of many influences leading to damage to lung tissue and the development of subsequent inflammation. Fibrosis is an overgrowth of connective tissue, which can lead to a violation of the architectonics of the lungs and reduce their functionality up to a fatal outcome. At the same time, the mechanisms underlying fibrogenesis are currently insufficiently studied. In this regard, the task of studying them does not lose its relevance, and its solution requires the development of models of lung fibrosis that can reflect all the key processes of fibrogenesis.

The *in vivo* model using animals has multiple undeniable advantages, but at the same time it has strict ethical limitations and does not reflect all the mechanisms of lung fibrosis inherent in the human body. At the same time, *in vitro* research, scientists can afford to use biomaterials not only of animals, but also of humans, and build cellular systems based on them — from 2D to 3D models. Modeling of pulmonary fibrosis is mainly based on the use of the main types of cells involved in the development of pulmonary fibrosis, such as myofibroblasts, fibroblasts, alveolocytes and others. Some models are also based on a specific fibrosis-associated extracellular matrix and further study of the interaction of cells with each other and with the matrix.

It should be borne in mind that different models display individual nuances of the native processes of lung fibrogenesis, which requires the research community to use a wide range of models. Taking into account the multifactorial pathogenesis of pulmonary fibrosis, it is important to understand the totality of the processes taking place in order to obtain the completeness of the real picture, close to the picture *in vivo*, and therefore the multicomponence of models is important. This review focuses on the analysis of various models of lung fibrosis *in vitro* in two-dimensional and three-dimensional systems, shows approaches to their creation, key differences, main advantages and disadvantages of models, both particular and general.

Keywords: pulmonary fibrosis, fibrosis models, myofibroblasts, TGF- β , spheroids, organoids, profibrotic matrix

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

For citation: Tolstoluzhinskaya A.E., Basalova N.A., Efimenko A.Y. Modern approaches to the creation of 2D and 3D cellular models for the study of lung fibrosis. *Tissue and organ regeneration*. 2023;1(2):7–32. <https://doi.org/10.60043/2949-5938-2023-2-7-32>

Received 02.11.2023

Revised 22.11.2023

Accepted 11.12.2023

Список сокращений:

БСА — бычий сывороточный альбумин

ВКМ — внеклеточный матрикс

ИПСК — индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

ИФЛ — идиопатический фиброз легких

ММР — металлопротеиназа

МСК — мезенхимные стромальные клетки

ПКЛ — переживающие культуры легких

ЭМП — эпителиально-мезенхимальный переход

ЭндМП — эндотелиально-мезенхимальный переход

CFTR — cystic fibrosis transmembrane regulator, трансмембранный регулятор муковисцидоза

FGF — fibroblast growth factor, фактор роста фибробластов

FLIP 3D printer — Fluid-supported Liquid Interface Polymerization (FLIP) 3D printer, 3D-принтер с полимеризацией поверхности раздела фаз жидкости

FLOAT — fast hydrogel stereolithography printing, быстрая гидрогелевая стереолитографическая печать

FN1 — fibronectin 1, фибронектин 1

PDGF — platelet-derived growth factor, фактор роста тромбоцитов

TGF- β — transforming growth factor- β , трансформирующий фактор роста бета α -актин — α -гладкомышечный актин (α -smooth muscle actin, α -SMA)**Фиброз легких**

Во время физиологических процессов ранозаживления, в том числе поврежденного легкого, целостность ткани может быть восстановлена не только путем возвращения структуры ткани к исходной, но и путем формирования устойчивого рубца и переходом в фибротическое состояние ткани. Фиброз развивается как следствие воспалительных реакций, возникающих, например, при тяжелых механических повреждениях, аллергиях, инфекционных заболеваниях, в частности при поражении организма вирусными агентами, такими как SARS-CoV-2, или при ингаляционных воздействиях факторов внешней среды, включая курение или частое вдыхание пыли [1–4]. Клеточное старение (сенесценция) и накопление мутаций в некоторых генах являются факторами, повышающими риск возникновения фиброза [5–8].

При этом следует отметить, что среди нозологий человека нет заболевания, которое бы носило название «фиброз легких». Однако существует ряд заболеваний, последствием которых является развитие воспаления, поражение альвеол и, как следствие, разрастание соедини-

тельной ткани в легких (рис. 1). К таким заболеваниям относят интерстициальные болезни легких, включая идиопатический фиброз легких (ИФЛ), идиопатическую неспецифическую интерстициальную пневмонию, экзогенные аллергические и токсические альвеолиты, синдром фиброзирующего альвеолита при диффузных болезнях соединительной ткани и другие заболевания, число которых сегодня по некоторым данным уже более 200 [9]. Несмотря на то что степень тяжести и скорость развития легочного фиброза при этих заболеваниях могут быть различны, значительное количество данных указывает на сходные патофизиологические механизмы, лежащие в основе развития легочного фиброза.

Клеточным организатором процессов ремоделирования ткани при фиброзе является *миофибробласт*, который секретирует большое количество компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ) и способствует его механическому сокращению путем контракции (рис. 1А) [10–12]. Факторы, выделяющиеся клетками в процессе воспаления, приводят к тому, что клетки-предшественники, в первую очередь тканеспеци-

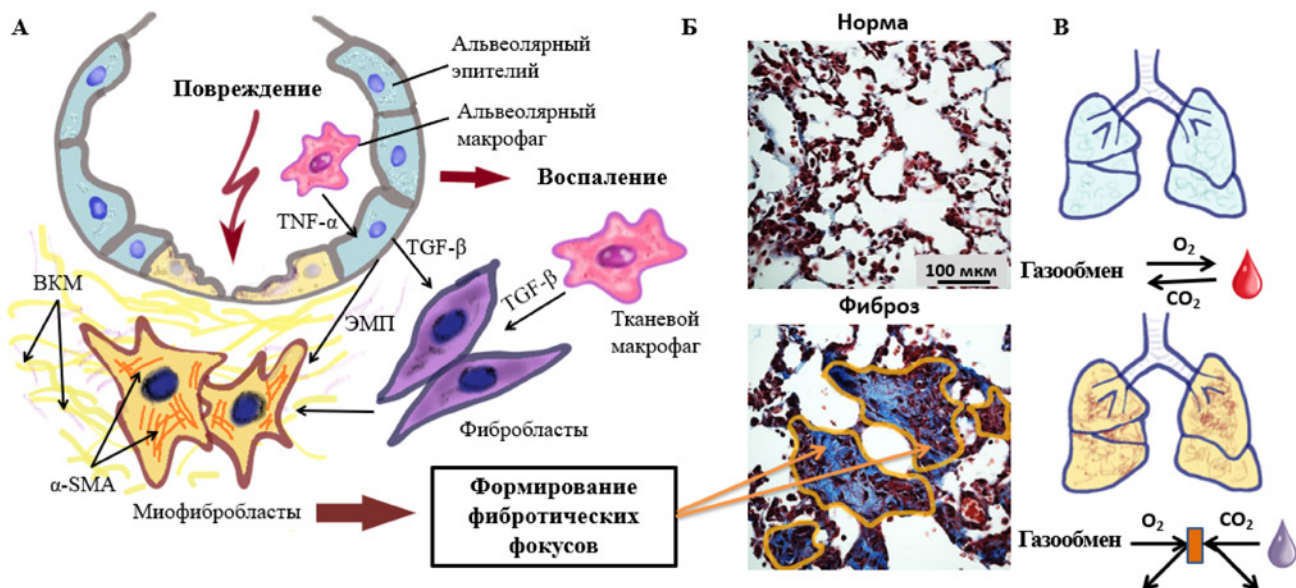


Рис. 1. Развитие фиброза легких сопровождается снижением дыхательной функции и может приводить к полной дисфункции органа и, как следствие, гибели организма: **А** — молекулярно-клеточный уровень, схема. Фиброз легких начинается с повреждения эпителия, которое провоцирует возникновение воспалительных процессов. Макрофаги, альвеолярные и тканевые, принимают непосредственное участие в запуске развития фиброза путем секреции цитокинов. TGF- β — основной профибротический фактор, приводит к дифференцировке фибробластов интерстиция легких в миофибробласты. TNF- α совместно с TGF- β способен индуцировать эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) альвеолоцитов, что может приводить их также к дифференцировке в миофибробласты. Миофибробласты отличаются наличием стресс-фибрилл, состоящих из α -SMA и способствующих сокращению внеклеточного матрикса (ВКМ), а также синтезу специфических молекул ВКМ: коллагена I, III типов, EDA-фибронектина, гиалуронана и других. Это приводит к возникновению тканевых единиц фиброза — фибротических фокусов; **Б** — тканевый уровень, гистологические срезы ткани легких мышей (трихром по Массону) в норме (верх) и при индукции фиброза интратрахеальным введением блеомицина (низ). Оранжевым цветом выделены фибротические фокусы; **В** — органнй уровень, схема. В норме проявляется функция легких — осуществление газообмена. При развитии фиброза утолщенная за счет избыточного количества фибротической ткани альвеолярная стенка препятствует нормальному газообмену, что может приводить к гипоксии

фичные фибробласты, массово подвергаются дифференцировке в миофибробласты [13]. При нормально протекающей регенерации ткани многие миофибробласты подвергаются апоптозу и элиминируются на терминальных стадиях процесса [14]. В случае тяжелых или хронических повреждений выражены воспалительные процессы, которые приводят к постоянному росту числа миофибробластов, приобретающих устойчивость к апоптозу и способных к самоподдержанию своей популяции. Эти клетки приводят к разрастанию соединительной ткани, замещающей функциональную ткань органа [15, 16], и формируют *фибротические фокусы*, представляющие собой зону неправильно уложенных фиброз-ассоциированных белков матрикса (рис. 1Б) [10, 17]. В итоге альвеолярные перегородки постепенно утолщаются, вместе с чем усложняется процесс газообмена и утрачивается исходная архитектура легких [18]. Про-

цесс фиброгенеза при приобретении прогрессирующего характера может привести к полному отказу работы органа и к летальному исходу, например в связи с дыхательной недостаточностью, ишемической болезнью легких, возникновением опухолевых образований [1, 3].

Основную движущую роль в запуске фиброза ткани и дифференцировки фибробластов в миофибробласты выполняет *трансформирующий фактор роста бета* (transforming growth factor- β , TGF- β), который синтезируется иммунными клетками и самими миофибробластами [11, 19]. Таргетные гены TGF- β -сигнального пути — это ACTA2, кодирующий α -гладкомышечный актин (α -smooth muscle actin, α SMA, или α -актин), COL1A1 и COL3A1, кодирующие, соответственно, коллаген I и коллаген III типов, TGF- β R, кодирующий рецептор к TGF- β , фибронектин (FN1), продукт гена которого при фиброзе преобразуется

в сплайс-вариант EDA-фибронектин, способный стимулировать ранние этапы дифференцировки миофиibroбластов [20, 21].

Популяция миофиibroбластов при фибротических заболеваниях довольно гетерогенна [22], но все они характеризуются синтезом α -актина, формирующего в клетках стресс-фибриллы, способствующих сокращению ВКМ, способностью к синтезу ВКМ с высоким показателем модуля упругости и состоящего из EDA-фибронектина, фибрина, коллагенов I, III, VI типов, гиалуронана, а также образованием комплексов фокальных контактов, называемых фибронексусами [10, 23–26]. Предшественниками миофиibroбластов могут быть различные клетки: весомая часть из них представляет собой резидентные или мигрировавшие под влиянием промигранторных воспалительных факторов в данную область ткани фибробласты, а также циркулирующие в крови фиброциты, перicyты, мезенхимные стромальные клетки (МСК) и иные клетки [13]. Известно, что в эпителиальных клетках запускаются механизмы, приводящие к потере своего исходного фенотипа и запускающие дифференцировку клеток в мезенхимный тип. Происходит эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), в результате чего в ткани, пораженной фиброзом, возникает большое число клеток, по многим признакам схожих с миофиibroбластами [22, 27–29]. Некоторые данные свидетельствуют о возникновении миофиibroбластов из клеток эндотелия через эндотелиально-мезенхимальный переход (ЭндоМП) [8, 30, 31], хотя вклад этого процесса в пополнение пула миофиibroбластов еще полностью не подтвержден.

Таким образом, фиброз легких является острой проблемой современного общества, так как он возникает вследствие множества причин, ведет за собой сбой в регуляции внутренних процессов организма и способен привести к гибели. По этой причине исследование механизмов, лежащих в основе его патогенеза, и поиск способов восстановления легочной ткани до состояния, обеспечивающего полноценную дыхательную функцию, является очень актуальным. Для решения этих задач должны быть использованы релевантные модели, позволяющие отражать ключевые процессы, заложенные в фиброгенезе. На данный момент разработан ряд моделей фиброза легких, имеющих как свои неоспоримые преимущества, так и некоторые недостатки, обзор которых представлен ниже.

Модели фиброза

Клеточная дифференцировка при фиброзе тканей и органов активно изучается учеными, но по-прежнему многие молекулярно-клеточные механизмы этого процесса остаются невыясненными. В настоящее время процессы фиброгенеза в легких изучают преимущественно на животных и клеточных моделях, представленных в виде культивируемых в виде монослоя клеток, то есть в 2D-культуре [6, 7, 32, 33]. Это далеко не единственные модели, которыми пользуются исследователи фибротических процессов. В связи с острой актуальностью изучения патогенеза фиброза последнее время исследователи разрабатывают новые варианты моделей разных мерностей (от 2D до 3D), что дает больше возможностей для изучения различных механизмов, лежащих в основе данного процесса.

Экспериментальные модели на животных

Модели на животных являются основными для исследования физиологических механизмов, происходящих в организме при развитии фиброза легких. Хотя хронические заболевания человека трудно поддаются моделированию, животная модель передает основные физиологические этапы прогрессирования фиброза, позволяет наблюдать за процессом дифференцировки разных типов клеток в естественных для них биологических условиях, а также позволяет изучать про- или антифибротический эффект тех или иных факторов [31, 34, 35].

Среди широко используемых моделей можно выделить следующие:

- модель силикоза (асбестоза) [36–38];
- модель радиационного облучения легких [25, 39];
- блеомицин-индуцированный фиброз [40, 41];
- флюоресцеин-изотиоционат-индуцированный фиброз [42, 43].

Каждая из описанных выше моделей имеет свои преимущества и недостатки. Однако к наиболее хорошо описанным и часто применяемым моделям, соответствующим патогенезу широкого спектра фибротических заболеваний легких человека, включая идиопатический фиброз легких, можно отнести модель фиброза легких, индуцированного блеомицином.

Блеомицин — это гликопептидный антибиотик, который первоначально был выделен из бактерии *Streptomyces verticillatus* [44]. Начало

его использования в качестве агента, вызывающего фиброз легких, было основано на том факте, что развитие фиброза было одним из основных побочных эффектов применения блеомицина при лечении опухолей различного генеза у человека. Считается, что в результате воздействия блеомицина образуются хелаты ионов металлов, которые взаимодействуют с кислородом [45]. Возникают свободные радикалы, приводящие к разрывам одно- и двухцепочечной ДНК в клетках и тем самым стимулирующие программируемую клеточную гибель. Повреждения ткани в результате действия активных форм кислорода могут привести к воспалительной реакции, вызывающей легочную токсичность, активацию фибробластов и последующий фиброз [46]. Показано, что основные гистологические признаки, такие как формирование фибротических фокусов, подплевральное поражение ткани легкого, облитерация респираторного отдела легких, увеличение количества альвеолярных макрофагов, у животных, получавших блеомицин, аналогичны изменениям у пациентов с диагностированным фиброзом легких [47]. Кроме того, блеомициновая модель довольно легко выполнима в лабораторных условиях и хорошо воспроизводима [34].

В настоящее время не существует модели животных, которая могла бы полностью воспроизвести все особенности фиброза легких человека, а особенно прогрессирующий и необратимый характер такого состояния [3, 48]. Многочисленные исследования показывают, что прекращение или удаление индуцирующего фиброз агента может привести к спонтанному разрешению фиброза и возвращению ткани легкого к нормальному физиологическому состоянию с минимальными проявлениями признаков фиброза [15, 49]. К тому же стоит учесть, что интерпретация результатов осложняется тем фактом, что некоторые животные, как, например, мыши, обладают некоторыми отличиями в анатомии дыхательных путей, клеточном составе легочной ткани и иммунитете по сравнению с человеком [50]. Помимо прочего, этические соображения стимулируют замену экспериментальных моделей на животных в соответствии с концепцией 3R Рассела и Берча (reduction, refinement, replacement) [51]. Поэтому в данной статье мы сфокусируемся на моделях фиброза легких *in vitro* и подробнее рассмотрим 2D- и 3D-клеточные модели.

Ex vivo: переживающие культуры легких

Одним из перспективных направлений в моделировании фиброза легких *ex vivo* является использование переживающих культур легких (ПКЛ). Для получения ПКЛ используют легочную ткань человека или животных, заполняют данный фрагмент агарозой с низкой температурой плавления, после чего получают срезы толщиной 250–1000 мкм [52] и культивируют их *in vitro*. При таком подходе ПКЛ сохраняют исходную нативную структуру легкого: его состав и биомеханические свойства ВКМ, резидентные клетки данного участка ткани легкого, что и делает их актуальной моделью для изучения легочного фиброза и тестирования лекарств в условиях пораженной ткани.

Для изучения фибротической ткани легкого используются ткани доноров с диагностированным фиброзом легких [53] или животных с индуцированным фиброзом легких [54].

С целью исследования динамики развития фиброза с помощью ПКЛ Alsafadi с коллегами предложили использовать ПКЛ из материала, полученного от пациентов со здоровыми легкими, а затем индуцировать раннюю стадию развития патологии путем добавления профибротических факторов, включая TGF- β и TNF- α (Tumor necrosis factor α , фактор некроза опухоли). Такая стратегия приводила к увеличению экспрессии фиброз-ассоциированных генов и к отложению профибротических белков ВКМ [55].

Преимущество такой *ex vivo* модели заключается в том, что ПКЛ позволяют снизить число животных для моделирования фиброза, а также использовать легкие одного животного или пациента для получения нескольких объектов для исследований с максимально похожими свойствами. Кроме того, использование ПКЛ дает возможность работы с нативным человеческим материалом [56]. Основные лимитирующие факторы такого подхода — это необходимость в свежеполученных тканях и короткий период культивирования такой системы *in vitro* — не более 1 недели [55].

Модели in vitro

Модели *in vitro* являются хорошей альтернативой моделям *in vivo*, поскольку они позволяют в различных системах, от 2D до 3D, использовать животные и человеческие клетки

для моделирования фиброза легких и изучать их различные свойства, включая пролиферативные, миграционные, адгезивные свойства или контрактильную способность, в том числе в динамике. Использование человеческих клеток обеспечивает воспроизведение ключевых механизмов, которые заложены в дифференцировке клеток при фиброгенезе именно человеческого организма и которые сложно воспроизвести на животных моделях [57]. Для моделирования процессов фиброза *in vitro* используют различные клетки легких, участвующие в развитии фиброза, например такие, как мезенхимные, эпителиальные, эндотелиальные и иммунные клетки. Наиболее распространенным типом клеток для моделей *in vitro* являются легочные фибробласты [57, 58]. Это связано с тем, что основным типом клеток, претерпевающих дифференцировку в миофибробласты, являются резидентные фибробласты, а также из-за относительной простоты их методов выделения и культивирования [22].

Стоит отметить, что фибробласты очень зависят от адгезивных взаимодействий с микроокружением, что, в свою очередь, регулирует клеточное поведение, включая дифференцировку, пролиферацию, апоптоз и миграцию. В связи с этим на фибробласты в особенной мере влияет мерность среды, в которой они находятся в культуре *in vitro* (рис. 2) [59].

Модели *in vitro* мерности 2,5D и выше также позволяют изучать влияние ВКМ, включая целые белки или функциональные домены белков [60,

61], и изменения в модуле упругости матрикса на фенотип (мио)фибробластов [60]. К тому же появляется возможность изучать влияние на клеточную дифференцировку и активность связанных с матриксом факторов, например TGF- β , FGF (fibroblast growth factor, фактор роста фибробластов) и других [59, 62].

2D-модель фиброза

Многие механизмы, заложенные в дифференцировке клеток при фиброзе, были установлены с помощью изучения двумерных культур, которые представляют собой монослой клеток на культуральном пластике. Такие модели достаточно просты в исполнении и позволяют делать множество повторов эксперимента [57].

Один из вариантов получения модели фиброза предполагает выделение фибробластов из легких и помещение их на пластиковую культуральную посуду, жесткая поверхность которой может активировать клетки и приводить к образованию стресс-фибрилл и фокальных контактов [12, 26]. Несмотря на доказанное влияние поверхности жесткого пластика на дифференцировку стромальных клеток в миофибробласты, далеко не все клетки культуры подвергаются данной дифференцировке без дополнительных профибротических стимулов.

Чтобы исследовать механизмы активации и дифференцировки миофибробластов, 2D-культуры часто подвергаются воздействию профибротических цитокинов, например TGF- β , после

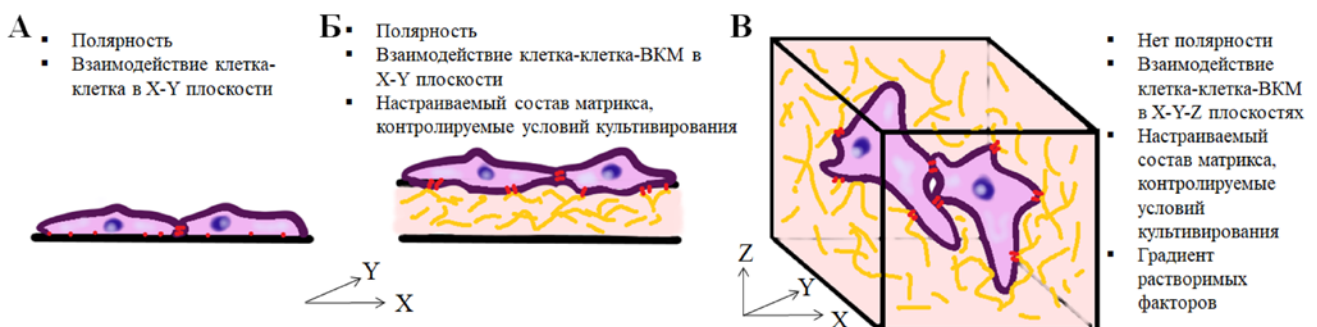


Рис. 2. Свойства клеток, например фибробластов, могут существенно отличаться в среде разной мерности: **А** – 2D-модели, представляющие собой клетки легких на культуральном пластике; **Б** – 2,5D-модели – слой внеклеточного матрикса (ВКМ) или гидрогеля с клетками на поверхности; **В** – 3D-модели, клетки в трехмерных условиях среды. Данные различия возникают в связи с разными свойствами условий культивирования, в первую очередь со свойствами и структурой ВКМ, а также влиянием различных сигналов, с которыми сталкивается клетка, в том числе адгезивными, топографическими, механическими, градиентными свойствами систем

короткого периода депривации для усиления профиброзного эффекта [11, 20, 21]. Важную роль в запуске дифференцировки клеток играет не только фактор роста TGF- β , но и иные факторы, к примеру TNF- α , который выделяется нейтрофилами и способствует ремоделированию цитоскелета клеток и изменению их механических свойств [40, 63].

Стоит отдельно отметить возможность использования культур клеток, выделенных непосредственно из биоптатов тканей пациентов или животных с фиброзом легких. Популяция выделяемых стромальных клеток уже является в значительной степени гетерогенной и содержит в себе эффекторные клетки фиброза, ответственные за его прогрессию, в частности фибробласты и миофибробласты, что дает возможность не использовать дополнительную стимуляцию для изучения различных клеточных типов [64].

В 2D-моделях также активно изучается влияние процесса старения (сенесценции) на развитие фиброза [7, 65, 66], поскольку сенесценция считается одним из важных факторов фиброза [6]. Культуры клеток подвергают радиационному облучению для индукции преждевременного старения или пассируют до стареющего фенотипа (остановка клеточного цикла, повышение экспрессии генов CDKN1A, CDKN2A, IL6 и IL8 и появление экспрессии основного маркера старения β -галактозидазы [66, 67]) с целью изучения участия сенесцентных клеток в фиброзе легкого *in vitro*. Так, было показано, что фибробласты, полученные от донора с фиброзом легких, в культуре стареют быстрее, чем фибробласты, выделенные из нормальной ткани [7], возможно, из-за большей восприимчивости к фактору TGF- β [68].

Недостатки модели

Несмотря на то что клеточная 2D-модель *in vitro* может воспроизводить основные процессы, заложенные при фиброзе, например дифференцировку клеток в миофибробласты, клетки в двумерной среде лишены типичных условий, характерных для тканей. Так, 2D-культура фибробластов приобретает некоторую полярность, которая присуща преимущественно эпителиальным клеткам, что может приводить к изменению нативных механизмов, с помощью которых опосредуется активация фибробластов с последующей их дифференцировкой. Например, было показано, что *in vitro* все три изоформы TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3) стимулируют

экспрессию α -гладкомышечного актина [69, 70]. Данные сведения отличаются от результатов, полученных *in vivo*: эти изоформы играют различные роли, что в тканях животных может обуславливаться различным микроокружением клеток [71]. К тому же в трехмерном микроокружении возникает дополнительное влияние ВКМ, изменяется механика и плотность системы [59].

2,5D-модели фиброза легких

Среди *in vitro* моделей ряд ученых [33, 183–185] также выделяют промежуточную мерность — 2,5D-модели фиброза. Такие системы отличаются от 2D-культур тем, что в них клетки контактируют не напрямую с поверхностью культуральной посуды, а адгезируют к сложной высокомолекулярной поверхности, обладающей собственными специфическими физико-химическими свойствами. К 2,5D-моделям можно отнести культивирование фиброз-ассоциированных клеток на слое гидрогеля или ВКМ или сэндвич-систему, представляющую собой слой клеток между двумя слоями гидрогелей. Данные подложки позволяют создавать специфический, более нативный субстрат для клеточной адгезии, однако клетки в культуре по-прежнему сохраняют контакт со средой культивирования.

Модели на основе гидрогелей представляют собой насыщенные молекулами воды природные, то есть на основе ВКМ [72], или синтетические полимеры, на поверхности которых культивируются активированные фибробласты, миофибробласты и другие клетки легких [72, 73]. Децеллюляризованный ВКМ легких может быть представлен в виде гидрогеля после расщепления ВКМ пепсином в кислой среде. В то же время такая процедура расщепления ВКМ приводит к потере исходного показателя модуля упругости матрикса в ткани и его структуры, и для восстановления данных параметров гидрогель-ВКМ необходимо смешивать с синтетическими полимерами [74]. Более щадящий многоступенчатый способ обработки ВКМ позволяет сохранить нативные биомеханические свойства ВКМ, в том числе фиброзной ткани: лиофилизация децеллюляризированной ткани, измельчение ее в порошок с последующей солубилизацией и желированием [75].

Наиболее популярными вариантами в такой системе, а также в 3D-системе подобного рода (см. главу «3D-модели») являются синтетические

гидрогели на основе полиакриламида из-за легко изменяемого параметра упругости, который можно настроить, регулируя относительные концентрации акриламида и бисакриламида [76]. Гидрогели, изготовленные из смеси полиакриламида и коллагена I типа наиболее изучены как система 2,5D- и 3D-культивирования для моделирования легочного фиброза, поскольку коллаген I типа является преобладающим типом коллагена в ВКМ, обнаруживаемом в фибротических фокусах [77]. Так, в полиакриламидных гелях, богатых коллагеном I типа, исследовано влияние показателя модуля упругости субстрата различной величины и влияние фактора TGF- β на дифференцировку фибробластов и их способность к миграции. По мере увеличения жесткости гидрогеля, то есть увеличения модуля упругости, и под влиянием TGF- β увеличивалось число дифференцированных миофибробластов с повышением экспрессии α -гладкомышечного актина и с образованием стресс-фибрилл [76, 78], а также способность клеток к миграции с соответствующим повышением экспрессии фактора PDGF [79]. Аналогичным образом активируется сигнальный путь FAK/Akt [80], который способствует отложению коллагена I типа и ингибированию матриксной металлопротеиназы MMP-1, и транскрипционный комплекс c-Fos и c-Jun, приводящий к увеличению синтеза α 6-интегрина, опосредующего инвазию миофибробластов и дальнейшее развитие фиброза легких [81].

Сэндвич-система культивирования представляет собой два слоя гидрогеля с разными значениями модуля упругости и расположенными между ними фибробластами/миофибробластами. Так, например, гидрогели в сэндвич-системе могут представлять собой полиакриламиды с различными модулями упругости с добавлением различных необходимых для роста клеток веществ (БСА, факторов роста и др.) и белков ВКМ. Такая система обеспечивает клеткам возможность адгезировать к обоим слоям гидрогелей, что исключает возникновение неспецифичной полярности [82].

Как уже говорилось выше, системы 2,5D обеспечивают более естественные условия для культивирования эффекторных клеток фиброза, так как поверхность пластиковой культуральной посуды покрывается компонентами, характерными для ткани здорового или фибротического легкого. Возникают более тесные взаимодействия меж-

ду клетками и ВКМ по сравнению с системами 2D. Однако в некоторых вариантах 2,5D-моделей остается возможность для возникновения полярности клеток и отсутствует градиент растворимости различных факторов, что имеет место *in vivo*. Из всех вышеперечисленных моделей только сэндвич-система позволяет создать условия для снижения возникновения полярности, но сами клетки, как и в остальных 2,5D-системах, не имеют возможности взаимодействовать друг с другом во всех плоскостях [60].

3D-модели фиброза легких

Трехмерные модели *in vitro* лучше всего воспроизводят микроокружение ткани легкого *in vivo* по сравнению с 2D- и 2,5D-моделями благодаря объемной структуре системы. Подобно моделям 2,5D здесь также могут имитироваться жесткость, то есть модуль упругости, и структура нативного матрикса и воспроизводиться соответствующие взаимодействия клеток с ВКМ. Помимо этого возникает вариативность клеток во взаимодействии друг с другом в связи с возникновением клеточной 3D-системы контактов. Кроме того, клетки, культивируемые в 3D-моделях, подвергаются воздействию градиентов растворимых факторов роста, аналогично условиям *in vivo* [59, 62].

Децеллюляризированные матриксы

Для большего приближения микроокружения культивируемых *in vitro* клеток к фибротическим условиям легких *in vivo* используют децеллюляризованную ткань легкого [26, 83, 84]. На данный момент существует множество детергентов для удаления клеточных компонентов, таких как Triton X-100 [75, 85–87], SDS (Sodium Dodecyl Sulfat, например 1% водный раствор) [88], бензоназная эндонуклеаза [89], дезоксихолат натрия [90, 91]. Одним из наиболее перспективных считается цвиттерионный детергент (3-((3-холомидопропил) диметиламмоний)-1-пропансульфонат, CHAPS), который обеспечивает минимальную потерю белков ВКМ, таких как эластин, коллаген и ламинины [92–94]. Чтобы удалить иммуногенную для других клеток остаточную ДНК в матриксе, фрагмент ткани инкубируют, например, в NaCl [75] и/или в растворе с ДНКазой [86]. Для стерилизации образцов используется слабый раствор надуксусной кислоты [93, 95] с этанолом или антибиотик [89].

Такая децеллюляризованная фибротическая легочная ткань человека позволяет исследовать

профибротические фенотипы фибробластов, активация которых вызвана патологически модифицированным ВКМ [96], или изучать влияние фибротического ВКМ легкого на активность и транскриптом культивируемых в нем первичных клеток легких [85].

Недостатком такой 3D-модели может являться то, что различные методы децеллюляризации и продолжительность воздействия реагентов протокола могут влиять на исходный состав матрикса, приводить к потере белков ВКМ и вымывать факторы роста, связанные с матриксом, например TGF- β , что делает сравнение и интерпретацию полученных результатов затруднительными.

Гидрогели 3D

Еще один вариант создания модели фиброза легких *in vitro* — это использование гидрогелей для воссоздания 3D-среды культивирования эффекторных клеток фиброза. Для моделирования фиброзных заболеваний используют гидрогели, аналогичные по составу тем, что используются в 2,5D-системах. Отличие гидрогелевых 3D-моделей от 2,5D заключается в том, что структура геля позволяет клеткам находиться не на поверхности геля, а в его толще [97, 98]. Это делает возможным контакт клеток между собой и со средой со всеми ее составляющими во всех плоскостях, что в итоге приводит к образованию сети из клеток [99]. Такую модель удобно использовать в том числе для оценки активации клеток через степень сжатия ими гидрогеля [98]: дифференцировка клеток в миофибробласты приводит к реорганизации цитоскелета и к возникновению контрактирующих сил, действующих на гидрогель и сжимающих его [60, 78].

Было проведено исследование влияния TGF- β на дифференцировку миофибробластов, в котором использовалась 3D-модель на основе гидрогеля из ВКМ с добавлением сшитого полиэтиленгликоля диакрилата, модифицированного желатиной (5%) и синтетической гиалуроновой кислоты. Такая модель сравнивалась с аналогичной моделью, но в 2,5D-системе, а также в 2D-культуре фибробластов. После обработки TGF- β (от 0,1 до 20 нг/мл) выяснилось, во-первых, что оптимальная концентрация TGF- β для дифференцировки клеток в миофибробласты составляет 5–10 нг/мл во всех моделях, а во-вторых, что в 3D-системе в отличие от 2,5D

значительно снижается экспрессия α -актина в присутствии гиалуроновой кислоты, а также снижается экспрессия коллагена I, III и фибронектина, но повышается активность металлопротеиназ 1-го и 2-го типа [72].

В 3D-системе коллагенового гидрогеля было показано, что фибронектин имеет важное значение для кластеризации клеток, которая происходит как во время гомеостаза, так и при фиброзе с образованием фибротических фокусов. На данной модели было показано, что это динамичный процесс, который зависит от баланса между сокращающимися ВКМ (мио)фибробластами и мигрирующими от сайта уплотнения фибробластами [100]. Оказалось, что для разрушения кластера клеток и деградации фибронектинового матрикса, характерного для фиброза, нужна в первую очередь MMP-2, а также промиграционные стимулы, например PDGF или сыворотка, которые позволяют клеткам мигрировать из фокуса [101].

С использованием 3D гидрогелевой системы был имитирован *in vitro* фиброз, вызываемый диоксидом кремния (SiO_2). В коллагеновом гидрогеле культивировали первичные фибробласты легких человека, на которые воздействовали молекулами SiO_2 . При этом, как наблюдалось в исследованиях, SiO_2 способствует увеличению миграции фибробластов через действие хемотаксического белка-1 моноцитов хемокина/цитокина MCP-1, который регулирует воспалительные процессы и имеет решающее значение в запуске фиброза [102, 103].

Помимо прочего, гидрогели, совместимые с 3D-культивированием клеток, являются основой для получения моделей легкого и легочного фиброза путем биопринтинга (см. главу «3D-биопечать»). Гидрогели природного или синтетического состава могут быть использованы как среда, в которую помещаются клетки при печати тканевой структуры, то есть так называемые биочернила [32, 104].

Одним из существенных ограничений использования гидрогелей в моделировании 3D является сложность длительного культивирования клеток из-за контракции и деградации гидрогеля в процессе культивирования. Природные гидрогели на основе ВКМ механически сложно настраиваемы из-за предварительной подготовки матрикса, что требует добавления

синтетических компонентов. Поэтому некоторые исследователи считают, что гидрогели не являются подходящими моделями *in vitro* для изучения клеточных взаимодействий [105]. Также, несмотря на возможное близкое сходство по клеточному и матричному составу, 3D-система на основе гидрогеля не может полностью имитировать фибротические условия ткани *in vivo*.

Клеточные сфероиды

Сфероиды легких представляют собой клетки легких взрослого организма, культивируемые в виде самособираемых сфероидальных агрегатов с использованием низкоадгезивных поверхностей [106, 107]. Кластеризации клеток в сфероиды способствуют в первую очередь адгезионные взаимодействия между клетками, а также взаимодействие фрагментов ВКМ, конкретнее фибронектина и его клеточного рецептора — интегрина $\alpha 5 \beta 1$ [108]. Кроме того, экзогенный фибронектин может способствовать уплотнению клеточных сфероидов, а его вклад в модуль упругости матрикса может приводить к дифференцировке клеток в миофибробласты [85, 109].

В настоящее время сфероиды как подходящий альтернативный вариант для исследования дифференцировки клеток и иных механизмов фиброгенеза используют в моделировании фибротических тканей легких или взаимодействия отдельных клеточных культур, отражающих основные механизмы фиброза [106]. Модель фиброза легких на основе сфероидов может представлять собой агрегаты из фибробластов или миофибробластов легких человека, что позволяет исследовать поведение клеток и их дифференцировку в 3D-мерности, аналогичной *in vivo*. Для получения сфероидов используют метод «висячей капли» или посуду с низкоадгезивным покрытием. В первом методе капли суспензии клеток располагают на крышку 96-луночного планшета или используют коммерческие системы культивирования висячих капель [110–113]. Второй метод получения сфероидов предполагает использование субстратов с низкоадгезивными, мягкими свойствами, например коллагеновый матрикс [100, 114–116], агарозу [107, 108, 117] или коммерческую посуду [109, 118, 119]. Например, используя колбы с низкоадгезивным покрытием, Cores с коллегами получали мультিকлеточные сфероиды, включающие в себя альвеолоциты II типа,

клетки эндотелия, различные стромальные клетки и другие [109]. Также существует способ использования супергидрофобных поверхностей, на которых формируется замкнутая капля, не контактирующая с данной не смачиваемой поверхностью, чтобы избежать воздействий, исходящих от контакта с ней [120–122].

При этом отмечено, что при сборке сфероидов из миофибробластов человека происходит их дедифференцировка, то есть потеря характерных для них черт, включая снижение уровня α -актина и виментина, а также низкое число пролифераций [10, 123]. По нашим предварительным данным было также показано, что миофибробласты сложнее самоорганизуются в сфероиды, в связи с чем получение сфероидов из них проблематичнее, чем, например, из фибробластов. Другой группой ученых, Granato с коллегами, было выявлено, что при сборке сфероидов из миофибробластов снижается уровень α -гладкомышечного актина и полностью исчезает экспрессия маркера пролиферации Ki-67 после 72 часов культивирования. Вероятно, миофибробласты при агрегировании в сфероид переходят во временное состояние покоя, хотя со временем такие клетки снова приобретают способность пролиферировать и могут приобрести морфологию миофибробластов под влиянием профибротических факторов [110]. В то же время в другой работе было показано, что при сборке сфероидов на низкоадгезивном коллагеновом матриксе из фибробластов человека также снижается их пролиферация, но происходит повышение экспрессии фибронектина, FGF, PDGF-A и TGF- β , характерных маркеров фиброза [114].

Интересным фактом является то, что в 2D-культуре возможна спонтанная сборка сфероидов из фибробластов легких под длительным воздействием TGF- β (10 нг/мл) [57]. Это является следствием накопления ВКМ, индуцированного TGF- β , что имитирует нарушение нормальной архитектуры ткани при фиброзе и напоминает формирующиеся *in vivo* фибротические фокусы, в том числе и по белковому составу матрикса.

Тап и его коллеги получили более сложные по клеточному составу сфероиды, объединив первичные эпителиальные клетки бронхов, фибробласты легких и микрососудистые эндотелиальные клетки легких взрослого человека для получения 3D-моделей дыхательных путей,

схожих по итоговому строению с органоидами [124]. Случайно посеянные смешанные клеточные популяции подверглись быстрой конденсации с последующей самоорганизацией в отдельные эпителиальные и эндотелиальные структуры, которые были стабильны и механически прочны до четырех недель культивирования. Такие сфероиды имитировали строение дыхательных путей *in vitro*, а добавление профибротического фактора TGF- β приводило к повышению экспрессии мезенхимных генов, вовлеченных в фиброз, причем как в фибробластах, так и в эпителиальных клетках модели [124].

Интересно, что существуют исследования, в которых использовались сфероиды клеток легких и МСК не как модели, а как терапевтические агенты для восстановления ткани легкого после воздействия на мышей блеомицином. Такие сфероиды вводились через хвостовую вену. Результаты показали, что введение сфероидов значительно ингибировало развитие блеомицин-индуцированного фиброза. При этом в некоторых работах отмечается непосредственная инфильтрация фибробластов и МСК в ткани, а в некоторых подчеркивается вклад их паракринной активности в процессе регенерации легочной ткани [109, 118, 125, 126].

Органоиды

Органоиды легких представляют собой самособирающиеся структуры из стволовых клеток (индуцированных стволовых клеток человека (ИПСК), эмбриональных стволовых клеток (ЭСК), стволовых клеток легких [95]), которые в условиях *in vitro* следуют последовательным этапам дифференцировки, в чем-то аналогичным процессу формирования легких в эмбриогенезе, что приближает их к нативному взаимодействию клеток в органе [127–129]. Органоиды преимущественно получают на низкоадгезивной поверхности так же, как и сфероиды [130, 131], а для улучшения выживаемости клеток полученные структуры часто далее культивируют, например в субстрате гидрогеля или матрикеля [124, 132, 133].

Наиболее распространенная классификация органоидов легких основана на типах функциональных клеток, которые входят в их состав. Так, можно выделить органоиды дыхательных путей, содержащие клетки, присущие преимущественно проводящим путям дыхательной системы, альвеолярные органоиды,

состоящие из альвеолоцитов I и II типов, и органоиды «смешанного» состава, включающие различные типы клеток, характерные для разных отделов легких [133]. При этом клетки в органоидах выстраиваются в соответствующие слои, схожие с гистологией тканей *in vivo*, образуя при этом полости «альвеол» или ходы «дыхательных путей».

Как было сказано выше, органоиды легких получают путем направленной дифференцировки стволовых клеток, чаще всего из ИПСК. Учитывая, что в эмбриогенезе легкое происходит из клеток передней кишки, на первом этапе получения органоидов индуцируют дифференцировку ИПСК в составе 3D-сфероидов в энтодерму путем добавления характерных для данного этапа факторов (например, активина А, участников Wnt-пути при одновременном ингибировании путей BMP/TGF- β) [95, 134, 135]. Далее в систему включаются факторы, необходимые для дальнейшей дифференцировки сфероида по типу легких, приводящих к образованию альвеол или/и ветвлению аналогов дыхательных путей [95, 131, 136, 137]. В результате образуются органоиды *in vitro*, включающие многие типы клеток дыхательных путей, в том числе базальные и реснитчатые клетки, альвеолоциты и мезенхимные клетки: фибробласты, миофибробласты, которые совместно экспрессируют α -актин и PDGFA, и дифференцированные гладкие мышцы, экспрессирующие α -актин [95, 129, 131, 138, 139].

Существует также вариант формирования органоидов легких через стадию получения мезенхимной популяции клеток из ИПСК. Мезенхимные клетки обеспечивают синтез белков ВКМ и различных растворимых белков, необходимых для микроокружения, специфичного для конкретного типа клеток легких, а их взаимодействие с эпителиальными клетками имеет важное значение для нормального развития органа [140]. Путем дальнейшей направленной дифференцировки клеток в 3D-модели, например через активацию TBX4 или активина А, пути Wnt, FGF10, образуются альвеолярные структуры и эпителиальные клетки, формирующие дыхательные пути в органоидах, через мезенхимно-эпителиальный переход [140, 141].

Одна из целей применения органоидов легких — это моделирование различных заболеваний. Так, например, альвеолярные органоиды

были использованы для изучения характеристик реакций клеток на вирус гриппа А (H1N1) и инфекцию, вызванную коронавирусом (SARS-CoV-2) [140, 142]. Такие альвеолярные органоиды могут быть заражены SARS-CoV-2, вследствие чего клетки в его составе начинают проявлять провоспалительный фенотип, экспрессируя характерные цитокины и хемокины, а также активировать экспрессию генов, связанных с апоптозом, при снижении экспрессии белков сурфактанта [143]. С помощью органоидов возможно моделирование и фиброза легких, хотя на данный момент подобных работ не так много. Например, на органоидах легких было изучено воздействие твердых частиц, которые могут являться компонентами загрязненного воздуха и приводить к фиброзу [142]. Было обнаружено, что воздействие твердых частиц приводит к повышению уровня транскрипции фиброз-ассоциированных генов в органоиде, таких как α -актин, виментин, коллаген I типа и к TGF- β 1-опосредованной активации ЭМП альвеолярного эпителия органоида [142, 144].

Получать органоиды легких для изучения фиброза также позволяет использование культур клеток, несущих определенные мутации. Так, например, из первично полученной культуры фибробластов донора с синдромом Германского — Пудлака, который проявляется, помимо иных симптомов, также фиброзом легких, были получены ИПСК, а затем органоиды легких. Клетки несли мутацию в гене AP3B1, который кодирует субъединицу белка, связанного с адаптером комплекса 3 (AP-3), необходимого для лизосомальной сортировки [145, 146]. Мутация в клетках приводит к накоплению профибротического ВКМ и мезенхимных клеток с соответствующими маркерами: α -гладкомышечным актином, виментином, рецепторами к PDGF [129].

Также существуют работы по получению моделей кистозного фиброза, или муковисцидоза, на основе органоидов легких. Например, использовались ИПСК человека, в которые предварительно была внесена мутация гена CFTR, что является наиболее частой причиной возникновения муковисцидоза среди людей [135]. В работе Sachs и коллег [147] описывается подход к созданию модели дыхательных путей взрослого организма на основе различных клеток из биопсии легкого человека с мутацией в гене CFTR, культивируемых в толще гидроге-

ля из подобия растворимой формы базальной мембраны, содержащего, например, ламинин, коллаген IV, протеогликаны гепарансульфата [148]. Органоиды *in vitro* дыхательных путей при наличии мутации в гене CFTR повторяли основные признаки заболевания и отличались повышенным содержанием ВКМ [147, 149].

Недостатки моделей легких на основе сфероидов и органоидов

Ограничением органоидов, в отличие от сфероидов, является их вариативный размер и форма, что затрудняет получение воспроизводимых результатов и их интерпретацию. Данное явление связано с возможными отклонениями в процессах дифференцировки клеток и формирования ими 3D-структуры, имитирующей структуру легкого. Следует также отметить, что во всех 3D-структурах неизбежно возникает некоторый градиент распределения веществ: доступность кислорода, метаболитов и других растворимых факторов резко различаются от центра до периферии структуры [125]. Такой градиент создает различные условия культивирования для клеток в центре и по периферии. Это может приводить, например, к гибели клеток в центре структуры из-за нехватки питательных веществ, гипоксии, ограниченной возможности для некоторых молекул или комплексов проникать в центр структуры, например внеклеточных везикул. В то же время считается, что наличие градиента веществ может приближать модель к воспроизведению неоднородного градиента в некоторых тканевых доменах *in vivo*, например фибротических фокусах [150].

3D-биопечать

Относительно новой областью тканевой инженерии является 3D-биопечать, представляющая собой процесс послойного точного позиционирования биологического материала, биохимических веществ и живых клеток [151, 152]. Важным условием создания такой конструкции является совместимость материала с клетками и одновременно с процессом печати. В настоящее время обычно такими материалами являются полимеры, полученные из тканей живых организмов (альгинат, желатин, коллаген, гиалуроновая кислота) или синтетические полимеры (полиэтиленгликоль) [153].

Пока данная технология активно развивается в сфере медицины для создания искусственных тканей и органов с целью трансплантологии

или для скрининга лекарств [154, 155]. Для исследовательских целей активно используется, например, модель фиброза печени, полученная путем 3D-биопечати [104, 156, 157], но биопринтинг в настоящее время не так широко распространен для создания моделей болезней легких, включая фиброз.

Недостатком этой модели фиброза *in vitro* является сложность создания структур малого размера: при точечном нанесении проблематично создавать выступающие или полые структуры, что требует применения, например, жестких каркасов [158]. Длительность печати некоторых 3D-биопридеров может снижать качество деталей, приводить к дегидратации, низкому уровню кислорода и температурному шоку, что может снижать жизнеспособность инкапсулированных клеток, которых требуется много для печати. Хотя стоит отметить, что сейчас появляются принтеры нового поколения, позволяющие печатать с увеличенной скоростью — 3D-принтер с полимеризацией поверхности раздела фаз жидкости (FLIP) или быстрая гидрогелевая стереолитографическая печать (FLOAT) [159, 160]. Но запатентованная технология печати и сложные экспериментальные установки делают данные системы практически недоступными для широкого использования исследовательским сообществом [32].

«Фиброз-на-чипе»

Благодаря биоинженерии на основе технологий микрофлюидики были созданы модели «орган-на-чипе» («орган-на-чипе»), в том числе «легкое-на-чипе», включая модель патологии «фиброз-на-чипе» [161]. Орган-на-чипе представляет устройство, чип, с камерами и каналами, в которых выращиваются культуры клеток в регулируемых условиях, что симулирует работу отдельных органов, тканей или процессов. Данная технология позволяет проектировать межклеточные и межтканевые взаимодействия, взаимодействия между органами (например, легкие — сердце — печень), а также физиологические механизмы, характерные для легких, например дыхательные движения или имитация газообмена в альвеолах [162, 163]. В такой системе есть возможность управлять клеточной средой с высокой точностью, включая механические и биохимические сигналы, что позволяет создавать более физиологически значимые условия и изучать влияние данных факторов на фибротические процессы [164, 165].

С помощью чипов была смоделирована ткань фибротического легкого с микро- и макрососудистой архитектурой, что позволяет контролируемо изучать в том числе и васкуляризацию [162, 166, 167]. На такой васкуляризированной модели фиброза легких-на-чипе было изучено влияние инородных частиц, поступающих из «альвеол» в «легочную сосудистую сеть» и вызывающих повреждение и воспаление, что запускает фиброз [162], а также механизм действия антифибротического препарата нинтеданиба, который способствовал снижению числа сосудов вокруг фибротического фокуса, ингибировал пролиферацию фибробластов и их инвазивные свойства [167].

Неоспоримым плюсом такой модели является возможность изучения различных антифибротических или иных препаратов на наличие побочных эффектов в «нецелевых» тканях и органах. Так, на примере мультиорган-на-чипе с микрореакторами органоидов легких, печени и сердца был подтвержден негативный эффект блеомицина [168], выражающийся в существенном изменении морфологии в «сердце» и увеличения экспрессии провоспалительных молекул в «легких».

Первоначально в создании органов-на-чипах присутствовала проблема короткого срока культивирования культур/орган-на-чипов из-за замкнутости системы и отсутствия смены питательной среды. Но фиброз легкого, развитие или его реверсия, представляет собой длительный процесс. Данный недостаток легких-на-чипах компенсировали созданием активных или пассивных насосных систем для удаления продуктов метаболизма и добавления новой питательной среды [163, 169].

Легкие-на-чипе, несмотря на свою приближенность к физиологическим условиям *in vivo*, не могут пока полноценно заменить все модели. Дорогостоящая техника и сложность создания моделей-на-чипах не позволяют внедрить модели для скрининга, в том числе для высокопроизводительного экспериментального или фармацевтического анализа фиброза легких.

Заключение

На данный момент процессы, отвечающие за возникновение и прогрессию фиброза легких, полностью не изучены, хотя эта проблема является крайне актуальной. Пока не сущест-

вует эффективных методов лечения, которые позволили бы остановить прогрессию идиопатических форм или способствовать реверсии фиброза легких. Одна из главных проблем, которая возникает при его изучении, — это подбор подходящих моделей, которые могли бы отразить те или иные механизмы фиброгенеза. Данный обзор посвящен разнообразию моделей фиброза легких, их плюсам и минусам и исследовательским возможностям.

Несмотря на то что в исследованиях все чаще предпочтение отдается 2,5D- и 3D-моделям из-за их лучшей имитации условий *in vivo*, 2D-исследования по-прежнему являются надежной экспе-

риментальной основой для исследований *in vitro* с целью изучения гипотез и дальнейшего подтверждения полученных данных на моделях более высокой мерности или *in vivo*. Благодаря относительной простоте 2D-модели и возможности в контролируемых условиях наблюдать за индивидуальными клеточными реакциями на растворимые сигналы, ее активно используют наравне с другими вариантами моделирования фибротических процессов легких. Другие модели фиброза легких приносят в эксперименты иные возможности для исследования, как, например, изучение реакции клеток на молекулы матрикса и его модуль упругости, что особенно часто изучается на 2,5D-моделях (рис. 3).

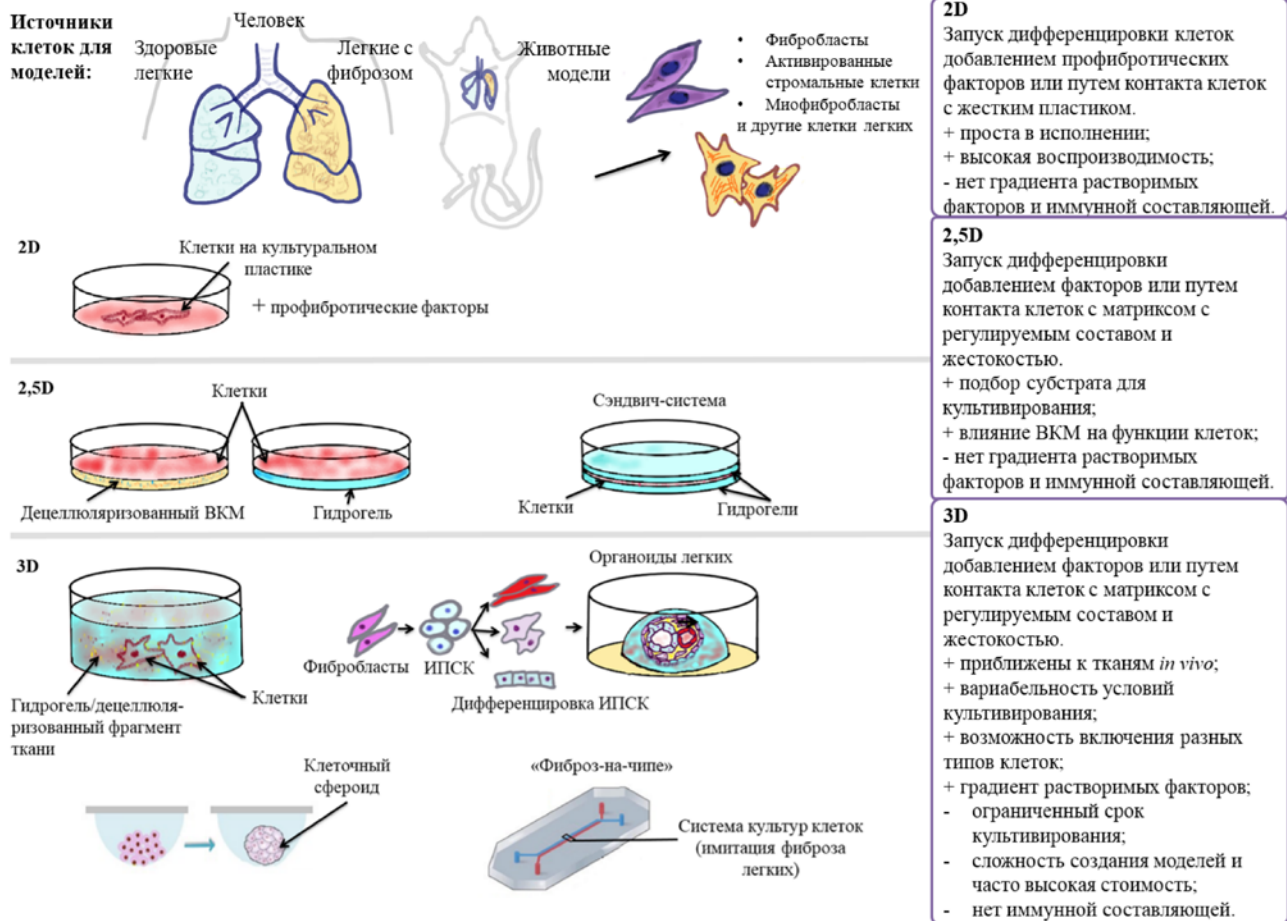


Рис. 3. Разнообразие моделей фиброза легких и основные источники материала для их получения: биоптаты, полученные из легких здорового человека или с диагностированным фиброзом, а также легкие животных, в том числе с индуцированным фиброзом. 2D-модели представляют собой клетки, культивируемые на культуральной посуде; 2,5D-модели включают в себя слой внеклеточного матрикса (ВКМ) или гидрогеля, на которых культивируются целевые клетки, участвующие в фиброзе легких, или два слоя гидрогеля, между которыми расположена культура; 3D-модели (слева направо): клетки, культивируемые в толще гидрогеля или децеллюляризованного матрикса, полученного из фрагмента ткани, сфероиды из клеток легкого, органоиды легких, полученные путем направленной дифференцировки индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), «легкое-на-чипе» и модификация этой модели «фиброза-на-чипе»

Однако мерность моделей влияет не только на возможность экспериментатора исследовать те или иные свойства клеточной культуры или мультিকлеточной системы, но и на морфологию самих клеток. Клетки, культивируемые на 2D-поверхности, приобретают апикально-базальную полярность, происходит миозин-опосредованное натяжение цитоскелета и усиление фокальной адгезии, что для них не является характерным и может приводить к изменению функций [59]. Данный эффект минимизируется в 3D-системах, так как у фибробластов возникает больше интегриновых сайтов адгезии и клетки могут вытягиваться в сторону всех трех плоскостей по сравнению с 2D-системами, что также позволяет им формировать более сложные структуры [59, 82, 111, 170]. К тому же в 3D-культурах клетки остаются в состоянии пролиферативного покоя, что позволяет лучше контролировать их активацию, например путем переноса клеток из сфероидов в 2D-культуру или обработки про-фибротическими факторами роста [171].

Сложные 3D-модели фиброза легких действительно приближают исследователей к реальной картине процессов в ткани *in vivo*, но многие из них в настоящее время имеют ограниченный срок культивирования и, соответственно, наблюдения. В свою очередь, фиброз часто приобретает прогрессирующий характер, динамика которого видна в течение длительного периода времени. В связи с этим нужно работать над увеличением срока работы моделей фиброза.

Основным недостатком весомого большинства моделей фиброза легких является отсутствие компонентов иммунной системы. Это отдаляет модели от физиологических процессов *in vivo*, то есть от реальной совокупности механизмов, в которых важнейшую роль играют компоненты иммунной системы. Этот недостаток в том числе не позволяет с высокой степенью надежности проводить скрининги перспективных антифибротических лекарственных препаратов и оценивать потенциальные риски их воздействия на организм. Изучение иммунных клеток является обязательной частью изучения фиброза, развитие которого происходит чаще всего как следствие воспаления [172, 173]. Внесение иммунного компонента в систему — то, к чему надо стремиться при моделировании фиброгенеза. Сегодня для изучения иммунологической компоненты преимущественно используют модели *in vivo* на животных или, например, анализируют отдельные популяции иммунных клеток, выделенных из биопсий больных фибро-

зом легких доноров или бронхоальвеолярного лаважа [174–177]. Ряд исследований проводится и на моделях *in vitro* [178–180]: изучение влияния секрета иммунных клеток на дифференцировку (мио)фибробластов в 2D-культурах [181] или, наоборот, влияние секрета фибротических клеток на активность клеток иммунитета [38]. Используют также со-культивирование фибробластов с лейкоцитами, макрофагами, нейтрофилами и другими клетками иммунитета, потенциально задействованными в развитии фиброза легких или его подавлении [182]. Предпринимаются единичные попытки создания более сложных моделей фиброза легких с иммунной составляющей. Например, получение альвеолярных органоидов, в которых демонстрируются критические патологические признаки легочного фиброза (воспаление, накопление коллагена), а некоторые клетки проявляют фенотипическое и функциональное сходство с макрофагами человека [56].

Воспалительные процессы, приводящие к фиброзу легких, это сложные сети передаваемых сигналов от клетки к клетке, которые имеют меняющийся во времени характер, что сильно усложняет построение корректных моделей. Но учеными предпринимаются попытки по созданию многокомпонентных моделей, направленных в том числе на изучение иммунной составляющей фиброгенеза.

Изучение фиброза легких — важная, но непростая задача, которая требует внимательного и тщательного подхода. В каждой из вышеперечисленных моделей нам удалось обозначить недостатки, но также назвать неоспоримые преимущества, благодаря которым исследователи часто обращаются к данным моделям. Учитывая, что фиброз легких — это многокомпонентный процесс со сложно регулируемыми клеточными и молекулярными составляющими, обойтись одной моделью для изучения всех заложенных в нем механизмов будет недостаточно, но их совокупность может позволить подойти к следующим открытиям и, возможно, открыть методы остановки прогрессии или даже реверсии фиброза легких.

Благодарности: Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-15-00198, <https://rscf.ru/project/23-15-00198/>

Acknowledgments: This study was supported by the Russian Science Foundation, grant № 23-15-00198, <https://rscf.ru/project/23-15-00198/>

Литература

1. Чучалин АГ, Авдеев СН, Айсанов ЗР и др. Клинические рекомендации Диагностика и лечение идиопатического легочного фиброза Федеральные клинические рекомендации. Пульмонология. 2016;26(4):399–419.
2. Kolahian S, Fernandez IE, Eickelberg O, Hartl D. Immune Mechanisms in Pulmonary Fibrosis. Translational Review. 2016;55(3):309–322.
3. Henderson NC, Rieder F, Wynn TA. Fibrosis: from mechanisms to medicines. Nature. 2020;587(7835):555–566.
4. George PM, Wells AU, Jenkins RG. Pulmonary fibrosis and COVID-19: the potential role for antifibrotic therapy. Lancet Respir Med . 2020;8(8):807–815.
5. Ovadya Y, Krizhanovsky V. Senescent cells: SASPected drivers of age-related pathologies. Biogerontology. 2014;15(6):627–642.
6. Schafer MJ, White TA, Iijima K, Haak AJ, Ligresti G, Atkinson EJ, et al. Cellular senescence mediates fibrotic pulmonary disease. Nat Commun. 2017;8:14532. DOI: 10.1038/ncomms14532
7. Yanai H, Shteinberg A, Porat Z, Budovsky A, Braiman A, Zeische R, et al. Cellular senescence-like features of lung fibroblasts derived from idiopathic pulmonary fibrosis patients. Aging (Albany NY). 2015;7(9):664–672.
8. Grigor'eva OA, Vigovskiy MA, D'yachkova UD, Basalova NA, Aleksandrushkina NA, Novoseleetskaya ES, et al. Induction mechanisms of endothelial-to-mesenchymal transition by components of the extracellular matrix in pulmonary fibrosis. Cell Technol Biol Med. 2021;2:97–106.
9. Капустина ВА, Овчаренко СИ. Эволюция классификации интерстициальных заболеваний легких. Что нового дает пересмотр классификации 2012. Пульмонология. 2013;3(15):33–35.
10. Herrera J, Forster C, Pengo T, Montero A, Swift J, Schwartz MA, et al. Registration of the extracellular matrix components constituting the fibroblastic focus in idiopathic pulmonary fibrosis. JCI Insight. 2019;4(1):e125185. DOI: 10.1172/jci.insight.125185
11. Hinz B. Formation and Function of the Myofibroblast during Tissue Repair. J Invest Dermatol. 2007;127(3):526–537.
12. Serini G, Gabbiani G. Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. Exp Cell Res. 1999;250(2):273–283.
13. El Agha E, Kramann R, Schneider RK, Li X, Seeger W, Humphreys BD, et al. Mesenchymal Stem Cells in Fibrotic Disease. Cell Stem Cell. Cell Press. 2017;21:166–177.
14. Rivka C. Stone, Irena Pastar, Nkemcho Ojeh VC. Epithelial-Mesenchymal Transition in Tissue Repair and Fibrosis. Cell Tissue Res. 2016;365(3):495–506.
15. Chua F, Gauldie J, Laurent GJ. Pulmonary Fibrosis. 2012;33(1):9–13.
16. Richeldi L, Collard HR, Jones MG. Idiopathic pulmonary fibrosis. Lancet. 2017;389(10082):1941–1952.
17. Herrera J, Henke CA, Bitterman PB. Extracellular matrix as a driver of progressive fibrosis. J Clin Invest. 2018;128(1):45–53.
18. Thannickal VJ, Toews GB, White ES, Lynch JP, Martinez FJ. Mechanisms of pulmonary fibrosis. Annu Rev Med. 2004;55:395–417.
19. Hu HH, Chen DQ, Wang YN, Feng YL, Cao G, Vaziri ND, et al. New insights into TGF- β /Smad signaling in tissue fibrosis. Chem Biol Interact. 2018;292:76–83.
20. Serini G, Bochaton-Piallat ML, Ropraz P, Geinoz A, Borsi L, Zardi L, et al. The Fibronectin Domain ED-A Is Crucial for Myofibroblastic Phenotype Induction by Transforming Growth Factor- β 1. J Cell Biol. 1998;142(3):873–881.
21. Vaughan MB, Howard EW, Tomasek JJ. Transforming growth factor-beta1 promotes the morphological and functional differentiation of the myofibroblast. Exp Cell Res. 2000;257(1):180–189.
22. Xie T, Wang Y, Deng N, Huang G, Taghavifar F, Geng Y, et al. Single-Cell Deconvolution of Fibroblast Heterogeneity in Mouse Pulmonary Fibrosis. Cell Rep. 2018;22(13):3625–3640.

23. Eyden BP. Brief review of the fibronexus and its significance for myofibroblastic differentiation and tumor diagnosis. *Ultrastruct Pathol.* 1993;17(6):611–622.
24. Guo DC, Papke CL, Tran-Fadulu V, Regalado ES, Avidan N, Johnson RJ, et al. Mutations in Smooth Muscle Alpha-Actin (ACTA2) Cause Coronary Artery Disease, Stroke, and Moyamoya Disease, Along with Thoracic Aortic Disease. *Am J Hum Genet.* 2009;84(5):617–627.
25. Cella L, D'Avino V, Palma G, Conson M, Liuzzi R, Picardi M, et al. Modeling the risk of radiation-induced lung fibrosis: Irradiated heart tissue is as important as irradiated lung. *Radiother Oncol.* 2015;117(1):36–43.
26. Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3(5):349–363.
27. Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest.* 2003;112(12):1776–1784.
28. Kletukhina S, Neustroeva O, James V, Rizvanov A, Gomzikova M. Role of Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles in Epithelial–Mesenchymal Transition. *Int J Mol Sci.* 2019;20(19):4813. DOI: 10.3390/ijms20194813
29. Deng CC, Hu YF, Zhu DH, Cheng Q, Gu JJ, Feng QL, et al. Single-cell RNA-seq reveals fibroblast heterogeneity and increased mesenchymal fibroblasts in human fibrotic skin diseases. *Nat Commun.* 2021;12:3709. DOI: 10.1038/s41467-021-24110-y
30. Eapen MS, Lu W, Gaikwad AV, Bhattarai P, Chia C, Hardikar A, et al. Endothelial to mesenchymal transition: a precursor to post-COVID-19 interstitial pulmonary fibrosis and vascular obliteration? *Eur Respir J.* 2020;56:2003167. DOI: 10.1183/13993003.03167-2020
31. Hashimoto N, Phan SH, Imaizumi K, Matsuo M, Nakashima H, Kawabe T, et al. Endothelial–Mesenchymal Transition in Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010;43(2):161–172.
32. van Grunsven LA. 3D in vitro models of liver fibrosis. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 2017;121:133–146.
33. Sundarakrishnan A, Chen Y, Black LD, Aldridge BB, Kaplan DL. Engineered cell and tissue models of pulmonary fibrosis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2018;129:78–94.
34. Moeller A, Ask K, Warburton D, Gauldie J, Kolb M. The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(3):362–382.
35. Jinta T, Miyazaki Y, Kishi M, Akashi T, Takemura T, Inase N, et al. The pathogenesis of chronic hypersensitivity pneumonitis in common with idiopathic pulmonary fibrosis: expression of apoptotic markers. *Am J Clin Pathol.* 2010;134(4):613–620.
36. Barnes H, Goh NSL, Leong TL, Hoy R. Silica-associated lung disease: An old-world exposure in modern industries. *Respirology.* 2019;24(12):1165–1175.
37. Fubini B, Hubbard A. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. *Free Radic Biol Med.* 2003;34(12):1507–1516.
38. Gregory AD, Kliment CR, Metz HE, Kim K-H, Kargl J, Agostini BA, et al. Neutrophil elastase promotes myofibroblast differentiation in lung fibrosis. *J Leukoc Biol.* 2015;98(2):143–152.
39. Jin H, Yoo Y, Kim Y, Kim Y, Cho J, Lee YS. Radiation-Induced Lung Fibrosis: Preclinical Animal Models and Therapeutic Strategies. *Cancers (Basel).* 2020;12(6):1–24.
40. Shao S, Qu Z, Liang Y, Xu Y, Zhou D, Li D, et al. Iguratimod decreases bleomycin-induced pulmonary fibrosis in association with inhibition of TNF- α in mice. *Int Immunopharmacol.* 2021;99(June):107936. DOI: 10.1016/j.intimp.2021.107936
41. Qian W, Cai X, Qian Q, Zhang W, Wang D. Astragaloside IV modulates TGF- β 1-dependent epithelial-mesenchymal transition in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *J Cell Mol Med.* 2018;22(9):4354–4365.
42. Kolodsick JE, Toews GB, Jakubzick C, Hogaboam C, Moore TA, McKenzie A, et al. Protection from Fluorescein Isothiocyanate-Induced Fibrosis in IL-13-Deficient, but Not IL-4-Deficient, Mice Results from Impaired Collagen Synthesis by Fibroblasts. *J Immunol.* 2004;172(7):4068–4076.
43. Christensen PJ, Goodman RE, Pastoriza L, Moore B, Toews GB. Induction of Lung Fibrosis in the Mouse by Intratracheal Instillation of Fluorescein Isothiocyanate Is Not T-Cell-Dependent. *Am J Pathol.* 1999;155(5):1773–1779.

44. Umezawa H, Maeda K, Takeuchi T, Bleomycin D, Coli E. Studies on bleomycin. *Cancer*. 1967;20(5):891–895.
45. Claussen CA, Long EC. Nucleic Acid recognition by metal complexes of bleomycin. *Chem Rev*. 1999;99(9):2797–2816.
46. Hecht SM. Bleomycin: New Perspectives on the Mechanism of Action. *J Nat Prod*. 2000;63(1):158–168.
47. Usuki J, Fukuda Y. Evolution of three patterns of intra-alveolar fibrosis produced by bleomycin in rats. *Pathol Int*. 1995;45(8):552–564.
48. Barkauskas CE, Noble PW. Cellular Mechanisms of Tissue Fibrosis. 7. New insights into the cellular mechanisms of pulmonary fibrosis. *Am J Physiol — Cell Physiol*. 2014;306(11):987–996.
49. Chung MP, Monick MM, Hamzeh NY, Butler NS, Powers LS, Hunninghake GW. Role of Repeated Lung Injury and Genetic Background in Bleomycin-Induced Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2012;29(3):375–380.
50. Bérubé K, Prytherch Z, Job C, Hughes T. Human primary bronchial lung cell constructs: the new respiratory models. *Toxicology*. 2010;278(3):311–318.
51. Lam AP, Flozak AS, Russell S, Wei J, Jain M, Mutlu GM, et al. Nuclear β -Catenin Is Increased in Systemic Sclerosis Pulmonary Fibrosis and Promotes Lung Fibroblast Migration and Proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;45(5):915.
52. Yanagihara T, Chong SG, Vierhout M, Hirota JA, Ask K, Kolb M. Current models of pulmonary fibrosis for future drug discovery efforts. *Expert Opin Drug Discov*. 2020;15(8):931–941.
53. Uhl FE, Vierkotten S, Wagner DE, Burgstaller G, Costa R, Koch I, et al. Preclinical validation and imaging of Wnt-induced repair in human 3D lung tissue cultures. *Eur Respir J*. 2015;46(4):1150–1566.
54. Hansen NUB, Karsdal MA, Brockbank S, Cruwys S, Rønnow S, Leeming DJ. Tissue turnover of collagen type I, III and elastin is elevated in the PCLS model of IPF and can be restored back to vehicle levels using a phosphodiesterase inhibitor. *Respir Res*. 2016;17(1):76. DOI: 10.1186/s12931-016-0394-8
55. Alsafadi HN, Staab-Weijnitz CA, Lehmann M, Lindner M, Peschel B, Königshoff M, et al. An ex vivo model to induce early fibrosis-like changes in human precision-cut lung slices. *Am J Physiol Cell Mol Physiol*. 2017;312(6):L896–L902.
56. Rasaei R, Tyagi A, Rasaei S, Lee SJ, Yang SR, Kim KS, et al. Human pluripotent stem cell-derived macrophages and macrophage-derived exosomes: therapeutic potential in pulmonary fibrosis. *Stem Cell Res Ther*. 2022;13(1):433. DOI: 10.1186/s13287-022-03136-z
57. Xu Q, Norman JT, Shrivastav S, Lucio-Cazana J, Kopp JB. In vitro models of TGF- β -induced fibrosis suitable for high-throughput screening of antifibrotic agents. *Am J Physiol — Ren Physiol*. 2007;293(2):631–640.
58. Cahill EF, Kennelly H, Carty F, Mahon BP, English K. Hepatocyte Growth Factor Is Required for Mesenchymal Stromal Cell Protection Against Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis. *Stem Cells Transl Med*. 2016;5(10):1307–1318.
59. Baker BM, Chen CS. Deconstructing the third dimension-how 3D culture microenvironments alter cellular cues. *Journal of Cell Science*. 2012;125:3015–3024.
60. Smithmyer ME, Sawicki LA, Kloxin AM. Hydrogel scaffolds as in vitro models to study fibroblast activation in wound healing and disease. *Biomaterials Science*. 2014;2:634–650.
61. Novoseletskaia ES, Grigorieva OA, Efimenko AY, Kalinina NI. Extracellular Matrix in the Regulation of Stem Cell Differentiation. *Biochem*. 2019;84(3):232–240.
62. Griffith LG, Swartz MA. Capturing complex 3D tissue physiology in vitro. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006;7(3):211–224.
63. Wang Q, Chiang ET, Lim M, Lai J, Rogers R, Janmey PA, et al. Changes in the biomechanical properties of neutrophils and endothelial cells during adhesion. *Blood*. 2001;97(3):660–668.
64. Coward WR, Feghali-Bostwick CA, Jenkins G, Knox AJ, Pang L. A central role for G9a and EZH2 in the epigenetic silencing of cyclooxygenase-2 in idiopathic pulmonary fibrosis. *FASEB J*. 2014;28(7):3183–3196.
65. Sundar IK, Rashid K, Gerloff J, Li D, Rahman I. Genetic ablation of p16 INK4a does not protect against cellular senescence in mouse models of chronic obstructive pulmonary disease/emphysema. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2018;59(2):189–199.

66. Hohmann MS, Habel DM, Coelho AL, Verri WA, Hogaboam CM. Quercetin enhances ligand-induced apoptosis in senescent idiopathic pulmonary fibrosis fibroblasts and reduces lung fibrosis in vivo. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2019;60(1):28–40.
67. Coppé JP, Patil CK, Rodier F, Sun Y, Muñoz DP, Goldstein J, et al. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol.* 2008;6(12):2853–2868.
68. Huang WT, Akhter H, Jiang C, MacEwen M, Ding Q, Antony V, et al. Plasminogen activator inhibitor 1, fibroblast apoptosis resistance, and aging-related susceptibility to lung fibrosis. *Exp Gerontol.* 2015;61:62–75.
69. Serini G, Gabbiani G. Modulation of α -smooth muscle actin expression in fibroblasts by transforming growth factor- β isoforms: An in vivo and in vitro study. *Wound Repair Regen.* 1996;4(2):278–287.
70. Massagué J, Andres J, Attisano L, Cheifetz S, López-Casillas F, Ohtsuki M, et al. TGF- β receptors. *Mol Reprod Dev.* 1992;32(2):99–104.
71. Grinnell F. Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction. *J Cell Biol.* 1994;124(4):401–404.
72. Chen X, Thibeault SL. Response of fibroblasts to transforming growth factor- β 1 on two-dimensional and in three-dimensional hyaluronan hydrogels. *Tissue Eng — Part A.* 2012;18(23–24):2528–2538.
73. Arora PD, Narani N, McCulloch CAG. The Compliance of Collagen Gels Regulates Transforming Growth Factor- β Induction of α -Smooth Muscle Actin in Fibroblasts. *Am J Pathol.* 1999;154(3):871–882.
74. Pouliot RA, Link PA, Mikhael NS, Schneck MB, Valentine MS, Kamga Gninzeke FJ, et al. Development and characterization of a naturally derived lung extracellular matrix hydrogel. *J Biomed Mater Res — Part A.* 2016;104(8):1922–1935.
75. Price AP, England KA, Matson AM, Blazar BR, Panoskaltsis-Mortari A. Development of a decellularized lung bioreactor system for bioengineering the lung: The matrix reloaded. *Tissue Eng — Part A.* 2010;16(8):2581–2591.
76. Tse JR, Engler AJ. Preparation of Hydrogel Substrates with Tunable Mechanical Properties. *Curr Protoc Cell Biol.* 2010;Chapter 10:10.16. DOI: 10.1002/0471143030.cb1016s47
77. Grinnell F, Petroll WM. Cell motility and mechanics in three-dimensional collagen matrices. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2010;26:335–361.
78. Arora PD, Narani N, McCulloch CAG. The Compliance of Collagen Gels Regulates Transforming Growth Factor- β Induction of α -Smooth Muscle Actin in Fibroblasts. *Am J Pathol.* 1999;154(3):871–882.
79. Asano S, Ito S, Takahashi K, Furuya K, Kondo M, Sokabe M, et al. Matrix stiffness regulates migration of human lung fibroblasts. *Physiol Rep.* 2017;5(9):e13281. DOI: 10.14814/phy2.13281
80. Giménez A, Duch P, Puig M, Gabasa M, Xaubet A, Alcaraz J. Dysregulated Collagen Homeostasis by Matrix Stiffening and TGF- β 1 in Fibroblasts from Idiopathic Pulmonary Fibrosis Patients: Role of FAK/Akt. *Int J Mol Sci.* 2017;18(11):2431. DOI: 10.3390/ijms18112431
81. Chen H, Qu J, Huang X, Kurundkar A, Zhu L, Yang N, et al. Mechanosensing by the α 6-integrin confers an invasive fibroblast phenotype and mediates lung fibrosis. *Nat Commun.* 2016;7:12564. DOI: 10.1038/ncomms12564
82. Beningo KA, Wang Y li. Double-Hydrogel Substrate as a Model System for Three-Dimensional Cell Culture. *Methods Mol Biol.* 2007;370:203–211.
83. Olsen AL, Bloomer SA, Chan EP, Gaça MDA, Georges PC, Sackey B, et al. Hepatic stellate cells require a stiff environment for myofibroblastic differentiation. *Am J Physiol — Gastrointest Liver Physiol.* 2011;301(1):G110–G118.
84. Li CX, Talele NP, Boo S, Koehler A, Knee-Walden E, Balestrini JL, et al. MicroRNA-21 preserves the fibrotic mechanical memory of mesenchymal stem cells. *Nat Mater.* 2017;16(3):379–389.
85. Parker MW, Rossi D, Peterson M, Smith K, Sikstrom K, White ES, et al. Fibrotic extracellular matrix activates a profibrotic positive feedback loop. *J Clin Invest.* 2014;124(4):1622–1635.

86. Booth AJ, Hadley R, Cornett AM, Dreffs AA, Matthes SA, Tsui JL, et al. Acellular normal and fibrotic human lung matrices as a culture system for in vitro investigation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012 Nov 1;186(9):866–876.
87. Vasse GF, Van Os L, De Jager M, Jonker MR, Borghuis T, Van Den Toorn LT, et al. Adipose Stromal Cell-Secretome Counteracts Profibrotic Signals From IPF Lung Matrices. *Front Pharmacol*. 2021;12:669037. DOI: 10.3389/fphar.2021.669037
88. Petersen TH, Calle EA, Colehour MB, Niklason LE. Matrix composition and mechanics of decellularized lung scaffolds. *Cells Tissues Organs*. 2012;195(3):222–231.
89. Hill RC, Calle EA, Dzieciatkowska M, Niklason LE, Hansen KC. Quantification of extracellular matrix proteins from a rat lung scaffold to provide a molecular readout for tissue engineering. *Mol Cell Proteomics*. 2015;14(4):961–973.
90. Narciso M, Ulldemolins A, Júnior C, Otero J, Navajas D, Farré R, et al. Novel Decellularization Method for Tissue Slices. *Front Bioeng Biotechnol*. 2022;10:832178. DOI: 10.3389/fbioe.2022.832178
91. G. Xiong, T. J. Flynn, J. Chen, C. Trinkle, R. Xu B. Development of an ex vivo breast cancer lung colonization model utilizing decellularized lung matrix. *Integr Biol*. 2015;7(12):1518–1525.
92. O'Neill JD, Anfang R, Anandappa A, Costa J, Javidfar J, Wobma HM, et al. Decellularization of human and porcine lung tissues for pulmonary tissue engineering. In: *Annals of Thoracic Surgery*. 2013;96(3):1046–1056.
93. Calle EA, Petersen TH, Niklason LE. Procedure for lung engineering. *J Vis Exp*. 2011;49:2651. DOI: 10.3791/2651
94. Sava P, Ramanathan A, Dobronyi A, Peng X, Sun H, Ledesma-Mendoza A, et al. Human pericytes adopt myofibroblast properties in the microenvironment of the IPF lung. *JCI Insight*. 2017;2(24):e96352. DOI: 10.1172/jci.insight.96352
95. Dye BR, Hill DR, Ferguson MA, Tsai YH, Nagy MS, Dyal R, et al. In vitro generation of human pluripotent stem cell derived lung organoids. *Elife*. 2015;4:e05098. DOI: 10.7554/Elife.05098
96. Badylak SF, Freytes DO, Gilbert TW. Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. *Acta Biomater*. 2009;5(1):1–13.
97. Chao J, Dai X, Peña T, Doyle DA, Guenther TM, Carlson MA. MCP1 regulates fibroblast migration in 3D collagen matrices downstream of MAP kinases and NF- κ B. *J Invest Dermatol*. 2015;135(12):2944–2954.
98. Yamanishi C, Parigoris E, Takayama S. Kinetic Analysis of Label-Free Microscale Collagen Gel Contraction Using Machine Learning-Aided Image Analysis. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020;8:582602. DOI: 10.3389/fbioe.2020.582602
99. Grinnell F, Ho CH, Tamariz E, Lee DJ, Skuta G. Dendritic Fibroblasts in Three-dimensional Collagen Matrices. *Mol Biol Cell*. 2003;14(2):384–395.
100. Rhee S, Ho CH, Grinnell F. Promigratory and Procontractile Growth Factor Environments Differentially Regulate Cell Morphogenesis. *Exp Cell Res*. 2010;316(2):232–244.
101. Da Rocha-Azevedo B, Ho CH, Grinnell F. PDGF-stimulated dispersal of cell clusters and disruption of fibronectin matrix on three-dimensional collagen matrices requires matrix metalloproteinase-2. *Mol Biol Cell*. 2015;26(6):1098–1105.
102. Liu X, Fang S, Liu H, Wang X, Dai X, Yin Q, et al. Role of human pulmonary fibroblast-derived MCP-1 in cell activation and migration in experimental silicosis. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2015;288(2):152–160.
103. Liu H, Dai X, Cheng Y, Fang S, Zhang Y, Wang X, et al. MCP1 mediates silica-induced cell migration in human pulmonary fibroblasts. *Am J Physiol — Lung Cell Mol Physiol*. 2016;310(2):L121–132.
104. Dey M, Ozbolat IT. 3D bioprinting of cells, tissues and organs. *Sci Rep*. 2020;10(1):14023. DOI: 10.1038/s41598-020-70086-y
105. Vazquez-Armendariz AI, Barroso MM, El Agha E, Herold S. 3D In Vitro Models: Novel Insights into Idiopathic Pulmonary Fibrosis Pathophysiology and Drug Screening. *Cells*. 2022;11(9):1526. DOI: 10.3390/cells11091526
106. Figtree GA, Bubb KJ, Tang O, Kizana E, Gentile C. Vascularized Cardiac Spheroids as Novel 3D in vitro Models to Study Cardiac Fibrosis. *Cells Tissues Organs*. 2017;204(3–4):191–198.

107. Dwek M, Schumacher U. *Metastasis Research Protocols Second Edition Methods in Molecular Biology*. New York: Springer Science + Business Media, 2014. 250 p.
108. Salmenperä P, Kankuri E, Bizik J, Sirén V, Virtanen I, Takahashi S, et al. Formation and activation of fibroblast spheroids depend on fibronectin–integrin interaction. *Exp Cell Res*. 2008;314(19):3444–3452.
109. Cores J, Hensley MT, Kinlaw K, Rikard SM, Dinh PU, Paudel D, et al. Safety and Efficacy of Allogeneic Lung Spheroid Cells in a Mismatched Rat Model of Pulmonary Fibrosis. *Stem Cells Transl Med*. 2017;6(10):1905–1916.
110. Granato G, Ruocco MR, Iaccarino A, Masone S, Cali G, Avagliano A, et al. Generation and analysis of spheroids from human primary skin myofibroblasts: An experimental system to study myofibroblasts deactivation. *Cell Death Discov*. 2017;3:17038. DOI: 10.1038/cddiscovery.2017.38
111. Foty R. A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3D spheroids. *J Vis Exp*. 2011;(51):2720. DOI: 10.3791/2720
112. Białkowska K, Komorowski P, Bryszewska M, Miłowska K. Spheroids as a Type of Three-Dimensional Cell Cultures—Examples of Methods of Preparation and the Most Important Application. *Int J Mol Sci*. 2020;21(17):6225. DOI: 10.3390/ijms21176225
113. Kosheleva N V., Efremov YM, Shavkuta BS, Zurina IM, Zhang D, Zhang Y, et al. Cell spheroid fusion: beyond liquid drops model. *Sci Rep*. 2020;10:12614. DOI: 10.1038/s41598-020-69540-8
114. Morimoto K, Kunii S. Latent nature of collagen in promoting three-dimensional adherent spheroid formation of fibroblasts. *Materialia*. 2019;8:100450. DOI: 10.1016/j.mtla.2019.100450
115. da Rocha-Azevedo B, Grinnell F. Fibroblast morphogenesis on 3D collagen matrices: The balance between cell clustering and cell migration. *Exp Cell Res*. 2013;319(16):2440–2446.
116. Menezes GC, Miron-Mendoza M, Ho CH, Jiang H, Grinnell F. Oncogenic Ras-transformed human fibroblasts exhibit differential changes in contraction and migration in 3D collagen matrices. *Exp Cell Res*. 2008;314(16):3081–3091.
117. Frongia C, Lorenzo C, Gianni F, Prevost GP, Ducommun B, Lobjois V, et al. 3D imaging of the response to CDC25 inhibition in multicellular spheroids. *Cancer Biol Ther*. 2009;8(23):2230–2236.
118. Henry E. Adult Lung Spheroid Cells Contain Progenitor Cells and Mediate Regeneration in Rodents With Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis. *Stem Cells Transl Med*. 2015;4(11):1265–1274.
119. Dinh PUC, Cores J, Hensley MT, Vandergriff AC, Tang J, Allen TA, et al. Derivation of therapeutic lung spheroid cells from minimally invasive transbronchial pulmonary biopsies. *Respir Res*. 2017;18(1):132. DOI: 10.1186/s12931-017-0611-0
120. Ferrari M, Cirisano F, Morán MC. Super Liquid-repellent Surfaces and 3D Spheroids Growth. *Front Biosci*. 2022;27(5):144. DOI: 10.31083/j.fbl2705144
121. Cirisano F, Ferrari M. Sustainable Materials for Liquid Repellent Coatings. *Coatings*. 2021;11(12):1508. DOI: 10.3390/coatings11121508
122. Neto AI, Correia CR, Oliveira MB, Rial-Hermida MI, Alvarez-Lorenzo C, Reis RL, et al. A novel hanging spherical drop system for the generation of cellular spheroids and high throughput combinatorial drug screening. *Biomater Sci*. 2015;3(4):581–585.
123. Liu F, Lagares D, Choi KM, Stopfer L, Marinković A, Vrbanc V, et al. Mechanosignaling through YAP and TAZ drives fibroblast activation and fibrosis. *Am J Physiol — Lung Cell Mol Physiol*. 2015;308(4):L344–L357.
124. Tan Q, Choi K, Sicard D, Tschumperlin D. Human airway organoid engineering as a step toward lung regeneration and disease modeling. *Biomaterials*. 2017;113:118–132.
125. Cesarz Z, Tamama K. Spheroid Culture of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int*. 2016;2016:9176357. DOI: 10.1155/2016/9176357
126. Dinh PUC, Paudel D, Brochu H, Popowski KD, Gracieux MC, Cores J, et al. Inhalation of lung spheroid cell secretome and exosomes promotes lung repair in pulmonary fibrosis. *Nat Commun*. 2020;11:1064. DOI: 10.1038/s41467-020-14344-7
127. McCracken KW, Catá EM, Crawford CM, Sinagoga KL, Schumacher M, Rockich BE, et al. Modeling human development and disease in pluripotent stem cell-derived gastric organoids. *Nature*. 2014;516(7531):400–404.

128. Wells JM, Spence JR. Primer Series: How to make an intestine. *Development*. 2014;141(4):752–760.
129. Korogi Y, Gotoh S, Ikeo S, Yamamoto Y, Sone N, Tamai K, et al. In Vitro Disease Modeling of Hermansky-Pudlak Syndrome Type 2 Using Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Alveolar Organoids. *Stem Cell Reports*. 2019;12(3):431–440.
130. Rock JR, Onaitis MW, Rawlins EL, Lu Y, Clark CP, Xue Y, et al. Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(31):12771–12775. DOI: 10.1073/pnas.0906850106
131. Miller AJ, Dye BR, Ferrer-Torres D, Hill DR, Overeem AW, Shea LD, et al. Generation of lung organoids from human pluripotent stem cells in vitro. *Nat Protoc*. 2019;14(2):518–540.
132. Willemse J, van der Laan LJW, de Jonge J, Verstegen MMA. Design by Nature: Emerging Applications of Native Liver Extracellular Matrix for Cholangiocyte Organoid-Based Regenerative Medicine. *Bioengineering*. 2022;9(3):110. DOI: 10.3390/bioengineering9030110
133. Demchenko A, Lavrov A, Smirnikhina S. Lung organoids: current strategies for generation and transplantation. *Cell Tissue Res*. 2022;390(3):317–333.
134. Spence JR, Mayhew CN, Rankin SA, Kuhar MF, Vallance JE, Tolle K, et al. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into intestinal tissue in vitro. *Nature*. 2011;470(7332):105–109.
135. Wong AP, Bear CE, Chin S, Pasceri P, Thompson TO, Huan LJ, et al. Directed differentiation of human pluripotent stem cells into mature airway epithelia expressing functional CFTR protein. *Nat Biotechnol*. 2012;30(9):876–882.
136. Bellusci S, Furuta Y, Rush MG, Henderson R, Winnier G, Hogan BLM. Involvement of Sonic hedgehog (Shh) in mouse embryonic lung growth and morphogenesis. *Development*. 1997;124(1):53–63.
137. Yuan T, Volckaert T, Chanda D, Thannickal VJ, De Langhe SP. Fgf10 Signaling in Lung Development, Homeostasis, Disease, and Repair After Injury. *Front Genet*. 2018;9:418. DOI: 10.3389/fgene.2018.00418
138. Fernandez RJ, Gardner ZJG, Slovik KJ, Liberti DC, Estep KN, Yang W, et al. GSK3 inhibition rescues growth and telomere dysfunction in dyskeratosis congenita iPSC-derived type II alveolar epithelial cells. *Elife*. 2022;11:e64430. DOI: 10.7554/eLife.64430
139. Chen L, Acciani T, Le Cras T, Lutzko C, Perl AKT. Dynamic Regulation of Platelet-Derived Growth Factor Receptor α Expression in Alveolar Fibroblasts during Realveolarization. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2012;47(4):517–527.
140. Tamai K, Sakai K, Yamaki H, Moriguchi K, Igura K, Maehana S, et al. iPSC-derived mesenchymal cells that support alveolar organoid development. *Cell Reports Methods*. 2022;2(10):100314. DOI: 10.1016/j.crmeth.2022.100314
141. Alber AB, Marquez HA, Ma L, Kwong G, Thapa BR, Villacorta-Martin C, et al. Directed differentiation of mouse pluripotent stem cells into functional lung-specific mesenchyme. *bioRxiv*. 2022;13;14(1):3488. DOI: 10.1038/s41467-023-39099-9
142. Kim JH, Kim J, Kim WJ, Choi YH, Yang SR, Hong SH. Diesel Particulate Matter 2.5 Induces Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Upregulation of SARS-CoV-2 Receptor during Human Pluripotent Stem Cell-Derived Alveolar Organoid Development. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(22):8410. DOI: 10.3390/ijerph17228410
143. Katsura H, Sontake V, Tata A, Kobayashi Y, Edwards CE, Heaton BE, et al. Human Lung Stem Cell-Based Alveolospheres Provide Insights into SARS-CoV-2-Mediated Interferon Responses and Pneumocyte Dysfunction. *Cell Stem Cell*. 2020;27(6):890–904.e8.
144. Lee H, Hwang-Bo H, Ji SY, Kim MY, Kim SY, Park C, et al. Diesel particulate matter2.5 promotes epithelial-mesenchymal transition of human retinal pigment epithelial cells via generation of reactive oxygen species. *Environ Pollut*. 2020;262:114301. DOI: 10.1016/j.envpol.2020.114301
145. Huizing M, Scher CD, Strovel E, Fitzpatrick DL, Hartnell LM, Anikster Y, et al. Nonsense mutations in ADTB3A cause complete deficiency of the β 3A subunit of adaptor complex-3 and severe Hermansky-Pudlak syndrome type 2. *Pediatr Res*. 2002;51(2):150–158.
146. Matsuyuki K, Ide M, Houjou K, Shima S, Tanaka S, Watanabe Y, et al. Novel AP3B1 mutations in a Hermansky-Pudlak syndrome type2 with neonatal interstitial lung disease. *Pediatr Allergy Immunol*. 2022;33(2):4–7.

147. Sachs N, Papaspyropoulos A, Ommen DDZ, Heo I, Böttinger L, Klay D, et al. Long-term expanding human airway organoids for disease modeling. *EMBO J.* 2019;38(4):e100300. DOI: 10.15252/embj.2018100300
148. Hughes CS, Postovit LM, Lajoie GA. Matrigel: a complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics* . 2010;10(9):1886–1890.
149. Kondrateva E, Panchuk I, Demchenko A, Grigorieva O, Zheglo D, Voronina E, et al. Generation of induced pluripotent stem cell line (RCMGi008-A) from human skin fibroblasts of a cystic fibrosis patient with compound heterozygous F508del/CFTRdele2.3 mutations in CFTR gene. *Stem Cell Res.* 2022;63:102854. DOI: 10.1016/j.scr.2022.102854
150. Cool CD, Groshong SD, Rai PR, Henson PM, Stewart JS, Brown KK. Fibroblast Foci Are Not Discrete Sites of Lung Injury or Repair: The Fibroblast Reticulum. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;174(6):654–658.
151. Murphy SV, Atala A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nat Biotechnol.* 2014;32(8):773–785.
152. Oakley F, Gee LM, Sheerin NS, Borthwick LA. Implementation of pre-clinical methodologies to study fibrosis and test anti-fibrotic therapy. Vol. 49, *Current Opinion in Pharmacology*. Elsevier Ltd. 2019;49:95–101.
153. Parikh MT. Unleashing bioprinting technology through patent intelligence. *Drug Discov Today.* 2021;26(6):1547–1555.
154. Mirza AA, Robinson TE, Gifford K, Guo HH. 3D Printing and the Cystic Fibrosis Lung. *J Cyst Fibros.* 2019;18(2):278–279.
155. Nof E, Artzy-Schnirman A, Bhardwaj S, Sabatan H, Waisman D, Hochwald O, et al. Ventilation-induced epithelial injury drives biological onset of lung trauma in vitro and is mitigated with prophylactic anti-inflammatory therapeutics. *Bioeng Transl Med.* 2022;7(2):e10271. DOI: 10.1002/btm2.10271
156. Lee H, Kim J, Choi Y, Cho DW. Application of Gelatin Bioinks and Cell-Printing Technology to Enhance Cell Delivery Capability for 3D Liver Fibrosis-on-a-Chip Development. *ACS Biomater Sci Eng.* 2020;6(4):2469–2477.
157. Cuvellier M, Ezan F, Oliveira H, Rose S, Fricain JC, Langouët S, et al. 3D culture of HepaRG cells in GelMa and its application to bioprinting of a multicellular hepatic model. *Biomaterials.* 2021;269:120611. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2020.120611
158. Grigoryan B, Paulsen SJ, Corbett DC, Sazer DW, Fortin CL, Zaita AJ, et al. Multivascular networks and functional intravascular topologies within biocompatible hydrogels. *Science.* 2019;364(6439):458–464.
159. Beh CW, Yew DS, Chai RJ, Chin SY, Seow Y, Hoon SS. A fluid-supported 3D hydrogel bioprinting method. *Biomaterials.* 2021;276:121034. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2021.121034.
160. Anandakrishnan N, Ye H, Guo Z, Chen Z, Mentkowski KI, Lang JK, et al. Fast Stereolithography Printing of Large-Scale Biocompatible Hydrogel Models. *Adv Healthc Mater.* 2021;10(10):e2002103. DOI: 10.1002/adhm.202002103
161. Bennet TJ, Randhawa A, Hua J, Cheung KC. Airway-On-A-Chip: Designs and Applications for Lung Repair and Disease. *Cells.* 2021;10(7):1602. DOI: 10.3390/cells10071602
162. Huh D, Matthews BD, Mammoto A, Montoya-Zavala M, Yuan Hsin H, Ingber DE. Reconstituting Organ-Level Lung Functions on a Chip. *Science.* 2010;328(5986):1662–1668.
163. Stucki JD, Hobi N, Galimov A, Stucki AO, Schneider-Daum N, Lehr CM, et al. Medium throughput breathing human primary cell alveolus-on-chip model. *Sci Rep.* 2018;8(1):14359. DOI: 10.1038/s41598-018-32523-x
164. Felder M, Trueeb B, Stucki AO, Borcard S, Stucki JD, Schnyder B, et al. Impaired wound healing of alveolar lung epithelial cells in a breathing lung-on-a-chip. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019;7:3. DOI: 10.3389/fbioe.2019.00003
165. Sengupta A, Roldan N, Kiener M, Froment L, Raggi G, Imler T, et al. A New Immortalized Human Alveolar Epithelial Cell Model to Study Lung Injury and Toxicity on a Breathing Lung-On-Chip System. *Front Toxicol.* 2022;4:840606. DOI: 10.3389/ftox.2022.840606

166. Akinbote A, Beltran-Sastre V, Cherubini M, Visone R, Hajal C, Cobanoglu D, et al. Classical and Non-classical Fibrosis Phenotypes Are Revealed by Lung and Cardiac Like Microvascular Tissues On-Chip. *Front Physiol.* 2021;12:735915. DOI: 10.3389/fphys.2021.735915
167. Zeinali S, Bichsel CA, Hobi N, Funke M, Marti TM, Schmid RA, et al. Human microvasculature-on-a chip: anti-neovascuogenic effect of nintedanib in vitro. *Angiogenesis.* 2018;21(4):861–871.
168. Skardal A, Murphy SV, Devarasetty M, Mead I, Kang HW, Seol YJ, et al. Multi-tissue interactions in an integrated three-tissue organ-on-a-chip platform. *Sci Rep.* 2017;7(1):8837. DOI: 10.1038/s41598-017-08879-x
169. Walker GM, Beebe DJ. A passive pumping method for microfluidic devices. *Lab Chip.* 2002;2(3):131–134.
170. Cukierman E, Pankov R, Stevens DR, Yamada KM. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science.* 2001;294(5547):1708–1712.
171. Kunz-Schughart LA, Wenninger S, Neumeier T, Seidl P, Knuechel R. Three-dimensional tissue structure affects sensitivity of fibroblasts to TGF- β 1. *Am J Physiol — Cell Physiol.* 2002;284(153-1):209–219.
172. Desai O, Winkler J, Minasyan M, Herzog EL. The role of immune and inflammatory cells in idiopathic pulmonary fibrosis. *Front Med.* 2018;5:43. DOI: 10.3389/fmed.2018.00043
173. Wynn TA, Vannella KM, Diseases I. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis Thomas. 2017;44(3):450–462.
174. Kinder BW, Brown KK, Schwarz MI, Ix JH, Kervitsky A, King TE. Baseline BAL neutrophilia predicts early mortality in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest.* 2008;133(1):226–232.
175. Kotsianidis I, Nakou E, Bouchliou I, Tzouveleakis A, Spanoudakis E, Steiropoulos P, et al. Global impairment of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;179(12):1121–1130.
176. Urata Y, Nishimura Y, Hirase T, Yokoyama M. Sphingosine 1-phosphate induces alpha-smooth muscle actin expression in lung fibroblasts via Rho-kinase. *Kobe J Med Sci.* 2005;51(1-2):17–27.
177. Yu YRA, Hotten DF, Malakhau Y, Volker E, Ghio AJ, Noble PW, et al. Flow cytometric analysis of myeloid cells in human blood, bronchoalveolar lavage, and lung tissues. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2016;54(1):13–24.
178. Lv J, Xiong Y, Li W, Yang W, He R, Alerts E. BLT1 Mediates Bleomycin-Induced Lung Fibrosis Independently of Neutrophils and CD4 + T Cells. *J Immunol.* 2017;198(4):1673–1684.
179. Mansouri N, Willis GR, Fernandez-Gonzalez A, Reis M, Nassiri S, Alex Mitsialis S, et al. Mesenchymal stromal cell exosomes prevent and revert experimental pulmonary fibrosis through modulation of monocyte phenotypes. *JCI Insight.* 2019;4(21):e128060. DOI: 10.1172/jci.insight.128060
180. McDonough JE, Ahangari F, Li Q, Jain S, Verleden SE, Maya JH, et al. Transcriptional regulatory model of fibrosis progression in the human lung. *JCI Insight.* 2019;4(22):131597. DOI: 10.1172/jci.insight.131597
181. Yanan L, Jing B, Yangyang B, Ulrike E, Peigang W, Kun S, et al. S100A4+ Macrophages Are Necessary for Pulmonary Fibrosis by Activating Lung Fibroblasts. *Front Immunol.* 2018;9:1776. DOI: 10.3389/fimmu.2018.01776
182. Celada LJ, Kropski JA, Herazo-maya JD, Luo W, Abad AT, Chioma OS, et al. PD-1 up-regulation on CD4+ T cells promotes pulmonary fibrosis through STAT3-mediated IL-17A and TGF- β 1 production. *Sci Transl Med.* 2018;10(460):eaar8356. DOI: 10.1126/scitranslmed.aar8356
183. Mark-Phillip P, Sabrina, AC., Prashanth A. A Novel 2.5D Culture Platform to Investigate the Role of Stiffness Gradients on Adhesion-Independent Cell Migration. *PLoS One.* 2014;9(10):e110453. DOI: 10.1371/journal.pone.0110453
184. Miyakawa M, Konno T, Kohno T, Kikuchi S, et al. Increase in epithelial permeability and cell metabolism by high mobility group box 1, inflammatory cytokines and tpen in CACO-2 cells as a novel model of inflammatory bowel disease. *International Journal of Molecular Sciences.* 2020;20(22):8434. DOI: 10.3390/ijms21228434
185. Toyjanova J, Flores-Cortez E, Reichner JS, Franck C, et al. Matrix confinement plays a pivotal role in regulating neutrophil-generated tractions, speed, and integrin utilization. *J Biol Chem.* 2015; 6(6):3752–3763.

Толстолужинская А.Е., Басалова Н.А., Ефименко А.Ю.

Современные подходы к созданию 2D- и 3D-клеточных моделей для изучения фиброза легких

Об авторах

Толстолужинская Анастасия Евгеньевна — лаборант-исследователь лаборатории репарации и регенерации тканей Института регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного центра МГУ имени М.В. Ломоносова; лаборант-исследователь НИЛ генных и клеточных технологий факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Басалова Наталия Андреевна — к.б.н., м.н.с. лаборатории репарации и регенерации тканей Института регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного центра МГУ имени М.В. Ломоносова; м.н.с. НИЛ генных и клеточных технологий факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова.

Ефименко Анастасия Юрьевна — к.м.н., заведующий лабораторией репарации и регенерации тканей Института регенеративной медицины Медицинского научно-образовательного центра МГУ имени М.В. Ломоносова; доцент кафедры биохимии и регенеративной биомедицины факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова

Authors

Anastasiya E. Tolstoluzhinskaya— research laboratory assistant at the Laboratory of Tissue Repair and Regeneration of the Institute for Regenerative Medicine of the Medical Scientific and Educational Center of Lomonosov Moscow State University; a research laboratory assistant at the Institute of Gene and Cell Technologies of the Faculty of Medicine of Lomonosov Moscow State University.

Nataliya A. Basalova— Ph.D. of Biological Sciences, junior research assistant of the Laboratory of Tissue Repair and Regeneration of the Institute for Regenerative Medicine of the Medical Scientific and Educational Center of Lomonosov Moscow State University; junior research assistant of the Research Institute of Gene and Cellular Technologies of the Faculty of Medicine of Lomonosov Moscow State University.

Anastasiya Y. Efimenko— M.D., Ph.D., head of the Laboratory of Tissue Repair and Regeneration of the Institute for Regenerative Medicine of the Medical Research and Educational Center of Lomonosov Moscow State University; Associate Professor of the Department of Biochemistry and Regenerative Biomedicine of the Faculty of Medicine of Lomonosov Moscow State University.